

UNIVERSITÉ DE PARIS
ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900

THÈSE

N° 2

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS
(PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 24 Décembre 1899

PAR

J.-A. CORDIER

PHARMACIEN **supérieur**, 1^{er} PRIX DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PARIS
ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DES HAUTES ÉTUDES AU MUSÉUM, DE L'INSTITUT PASTEUR
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS,
CHARGÉ DE COURS A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE REIMS
DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DE LA MARNE
MEMBRE DU CONSEIL D'HYGIÈNE DE REIMS

RECHERCHES SUR LES LEVURES

DU

VIGNOBLE DE CHAMPAGNE

CONTRIBUTION A LA BIOLOGIE DES LEVURES DE VINS

Président : M. MILNE-EDWARDS.

Juges : MM. { GUIGNARD, professeur.
RADAIS, agrégé.

PARIS

SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS SCIENTIFIQUES

PLACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

4, Rue Antoine - Dubois, 4

DU MÊME AUTEUR

- Recherches sur l'Anatomie comparée de l'Estomac des Ruminants.** — Thèse de pharmacien supérieur. Annales des Sciences naturelles, Zoologie, t. XVI, 1894.
- Sur l'estomac du Cerf de David.** — Comptes rendus de la Société philomatique, 1895, n° 4.
- Sur un procédé de délimitation des régions glandulaires dans la muqueuse du tube digestif.** — Comptes rendus de la Société philomatique, 1894, n° 6.
- Quelques remarques sur l'Anatomie comparée de l'Estomac des Kanguroos.** — Comptes rendus de la Société philomatique, 1894, n° 6.
- Sur un procédé de recherche des particules solides en suspension dans les liquides, Application à la microbiologie.** — En collaboration avec M. LAJOUX. — Union médicale du Nord-Est, 1895.
- Sur quelques expériences relatives à la conservation des germes pathogènes dans les eaux d'égouts de la ville de Reims.** — Union médicale du Nord-Est 1897.
- Remarques sur la préparation du Baume du Canada employé en micrographie.** — Union médicale du Nord-Est, 1897.
- Observations sur le Chondrostoma Nasus.** — Union médicale du Nord-Est et Journal de la Pisciculture pratique, 1898.
- Observations sur le séro-diagnostic de la Fièvre typhoïde.** — Bulletin de la Société médicale de Reims, 1898.
- L'Etat actuel de l'industrie des vins de Champagne.** — Etude biologique. — Revue générale des Sciences, février 1899.
- Etude sur la seconde fermentation des vins de Champagne.** — Revue de Viticulture, 1899.
-

UNIVERSITÉ DE PARIS
ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PHARMACIE

Année 1899-1900

THÈSE

N° 2

POUR LE

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS (PHARMACIE)

Présentée et soutenue le 21 Décembre 1899

PAR

J.-A. CORDIER

PHARMACIEN **supérieur**, 1^{er} PRIX DE L'ÉCOLE SUPÉRIEURE DE PARIS
ANCIEN ÉLÈVE DE L'ÉCOLE DES HAUTES ÉTUDES AU MUSÉUM, DE L'INSTITUT PASTEUR
ANCIEN INTERNE DES HÔPITAUX DE PARIS,
CHARGÉ DE COURS A L'ÉCOLE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE REIMS
DIRECTEUR DU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE DE LA MARNE
MEMBRE DU CONSEIL D'HYGIÈNE DE REIMS

RECHERCHES SUR LES LEVURES

DU

VIGNOBLE DE CHAMPAGNE

CONTRIBUTION A LA BIOLOGIE DES LEVURES DE VINS

Président : M. MILNE-EDWARDS.

Juges : MM. { GUIGNARD, professeur.
RADAIS, agrégé.

PARIS

SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS SCIENTIFIQUES

PLACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

4, Rue Antoine - Dubois, 4



École supérieure de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. G. PLANCHON, Directeur, O ,  I.
A. MILNE-EDWARDS, Assesseur, Membre de l'Institut, C ,  I.
É. MADOUË, Secrétaire,  I.

PROFESSEURS

MM. PLANCHON, O  ,  I.....	Matière médicale.
A. MILNE-EDWARDS, Membre de l'Institut, C  ,  I.....	Zoologie.
JUNGFLEISCH,  ,  I.....	Chimie organique.
LE ROUX, O  ,  I.....	Physique.
BOUCHARDAT, C  ,  I.....	Hydrologie et Minéralogie.
PRUNIER,  ,  I.....	Pharmacie chimique.
MOISSAN, Membre de l'Institut, O  ,  I.....	Chimie minérale.
GUIGNARD, Membre de l'Institut,  ,  I.....	Botanique générale.
VILLIERS-MORIAMÉ,  ,  I.....	Chimie analytique.
BOURQUELOT,  ,  I.....	Pharmacie galénique.
BEAUREGARD,  ,  I.....	Cryptogamie.
N.....	Toxicologie.

Directeur et professeur honoraire : M. CHATIN, Membre de l'Institut, O ,  I.
Professeurs honoraires : MM. BERTHELOT, Membre de l'Institut, G. C. ,  I.
MARCHAND, ,  I. RICHE, O ,  I.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. BERTHELOT,  A.	MM. MOUREU.
OUVRARD,  I.	COUTIÈRE.
RADAIS,  A.	GRIMBERT.
LEBEAU,  A.	PERROT,  A.

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. GUERBET	Chimie générale.
LEXTREIT,  I	Chimie analytique.
GUÉRIN,  A.....	Micrographie.
QUESNEVILLE,  I	Physique.
LUTZ.....	Microbiologie.

Chef du Laboratoire des examens pratiques : M. CHASTAING,  I.

Bibliothécaire : M. DORVEAUX,  I

INTRODUCTION

Depuis une trentaine d'années, l'étude des *Saccharomyces* ou levures proprement dites, a fait l'objet de nombreux travaux. Certains de ces champignons se rencontrent dans la nature à la surface des fruits charnus, au moment de la maturité ; mais on les observe plus facilement à l'état de cellules isolées dans les moûts extraits de ces fruits, où ils se développent abondamment en provoquant une fermentation alcoolique. L'industrie utilise aussi, depuis un temps immémorial, des *Saccharomyces* pour la fermentation des liquides sucrés artificiels, tels que les moûts de bière ; mais nous ne pouvons que supposer leur parenté avec les levures de fruits, dont il sera seulement question ici.

L'aspect dissocié des levures, comparé à des formes analogues présentées par des champignons plus élevés en organisation, a conduit à penser, de bonne heure, que ces ferments pourraient bien ne constituer qu'un état particulier de certains champignons, adapté à des conditions biologiques spéciales. Pasteur, en 1876, dans ses études sur la bière, a, le premier, posé nettement le problème de l'origine des *Saccharomyces*. Il ne faut point se dissimuler les difficultés qu'il suscite, et on a cher-

ché à le résoudre, en l'abordant par bien des côtés différents. Un certain nombre de savants se sont appliqués à nous faire connaître les divers habitats de ces organismes dans la nature, et les noms de Pasteur, de Hansen, de Boutroux, de Berlèse, restent attachés à ces délicates recherches. D'autres savants, au contraire, se sont efforcés d'identifier avec les vrais *Saccharomyces*, des champignons ferments plus élevés en organisation, ou encore, à provoquer chez les levures, des formes mycéliennes révélatrices de cette origine. Parmi ces derniers, il convient de nommer Jühler, Joergensen, Klöcker et Schiønning.

Les mémoires relatifs aux *Saccharomyces* se sont tellement accumulés, qu'ils constituent une bibliographie considérable (1), dont un récent ouvrage de A. Joergensen [29], donnera une idée suffisamment exacte; aussi, mon intention est-elle de ne relater ici que les travaux se rattachant spécialement à mes observations personnelles, et au but principal de ma recherche. Obligé, d'ailleurs, par l'ampleur d'un sujet aussi vaste et aussi compliqué, de me limiter à la solution d'un point particulier et bien déterminé de la question, j'ai dû laisser à peu près complètement de côté la seconde série de recherches que je viens de signaler; en ce qui concerne toutefois celles qui se rattachent à la culture sur des milieux artificiels. Cédant au contraire à une prédilection marquée pour les observations biologiques, tous mes efforts ont porté principalement, dans les années 1896, 1897, 1898, sur l'apparition, tou-

(1) Environ 1100 publications.

jours énigmatique, d'une espèce bien déterminée de levure à la surface du raisin, espérant y trouver un guide précieux, et d'excellents renseignements, dans la question de l'origine des *Saccharomyces*, le but que je me suis efforcé d'atteindre.

Le laboratoire de bactériologie de Reims se trouve dans des conditions exceptionnelles pour un semblable travail. Déjà, M. Joergensen, dont les recherches sur la descendance des *Saccharomyces* à partir du *Dematium pullulans* sont encore présentes à la mémoire, par les nombreuses tentatives de vérification qu'elles ont suscitées, recommande de se placer dans les conditions les plus naturelles, et y insiste avec raison. On peut dire que, contrairement à celles dans lesquelles ont dû travailler les auteurs danois, elles sont ici admirablement réalisées. Le clos Pommery (1), dont la tenue est comparable à celle du jardin le mieux soigné, au sommet d'un monticule bien exposé aux vents, se trouve en effet à moins d'un kilomètre du laboratoire, et la plus large hospitalité y est offerte à ceux qui désirent y poursuivre des recherches sur la vigne. Là, pour expérimenter, plus de raisins de serre, ni de treille, ni de provenances diverses et éloignées ; mais bien l'antique cépage du pays, offrant en plein champ le développement de son fruit, depuis l'apparition du bourgeon jusqu'à la disparition de la feuille. A ces conditions idéales, il faut surtout ajouter l'absence totale de végétaux étrangers à la vigne, grands ou petits, dans un rayon de plusieurs centaines de mètres ; grâce

(1) Où M. Pasteur fit les premières expériences de destruction des espèces animales nuisibles par les virus.

à cet éloignement, ces plantes ne peuvent apporter qu'une perturbation négligeable dans l'expérimentation.

Les recherches que je poursuis d'autre part sur la vinification champenoise, toutes d'actualité avec l'emploi moderne des levures sélectionnées, ne m'ont point détourné du but principal que je me suis efforcé d'atteindre; au contraire, l'exposition des résultats qu'elles m'ont fourni est indispensable pour l'intelligence de la partie principale de mon sujet, et forme en quelque sorte avec elle un tout biologique local des plus intéressants. Dans cette vieille industrie champenoise des vins mousseux, d'apparence bien primitive, mais en réalité si parfaite, on se trouve en présence de coutumes séculaires, que l'on est étonné de trouver conformes aux données les plus récentes de la science des ferments et des fermentations.

Je tiens tout particulièrement à remercier ici mes anciens maîtres de l'École supérieure de pharmacie de Paris, MM. Guignard et Radais, aux bienveillants conseils de qui j'ai dû avoir souvent recours, dans ces recherches aussi longues que délicates.

CHAPITRE PREMIER

GÉNÉRALITÉS SUR LA TECHNIQUE. — CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DU DEMATIUM PULLULANS

§ I. — Technique

Dans ses recherches, datant de 1883, sur la conservation des ferments alcooliques dans la nature, M. Boutroux [8] emploie encore, comme ses devanciers, les milieux liquides, eau sucrée additionnée de quelques sels appropriés, jus de cerise, dans lesquels il se contente de placer ses prises d'essai. Cette technique peut être excellente pour savoir si un échantillon donné recèle quelque ferment alcoolique susceptible de se développer dans ces conditions ; mais quels renseignements peut-elle fournir, lorsqu'il s'agit de constater : 1^o la pluralité des espèces ou races de levure dont cet échantillon se trouve porteur ; 2^o la présence d'espèces supposées différentes des *Saccharomyces*, telles que les *Dematium* et les moisissures en général ; 3^o la *proportion numérique* approximative de ces différents organismes ? Certainement aucun.

Pour étudier les formes levure appartenant à la flore d'un cru, une technique plus moderne exige leur isolement en culture pure ; ce n'est qu'ensuite que l'on est autorisé à déterminer séparément leurs principales constantes biologiques, et à établir par l'expérience, quelle part peut revenir à cha-

cune d'ellés dans le résultat final de la fermentation. Aussi, dès le début, les *desiderata* précédents m'ont-ils amené à faire un emploi général des ensemencements largement pratiqués en surface.

1. — *Extraction des moûts. — Stérilisation.* — Pour obtenir des résultats pratiques et surtout comparables, il est nécessaire de se rapprocher le plus possible des conditions offertes par la nature, et bien qu'en général on puisse cultiver les levures sur des milieux très variés, ainsi que l'ont montré les études sur la fermentation des moûts de bière, je me suis astreint à n'utiliser jamais que du moût de raisin stérilisé, qu'il est facile de se procurer et de conserver dans les laboratoires.

Les raisins dont je me suis servi pour obtenir mes moûts de culture provenaient des vendanges locales, et je signale comme ayant son importance, l'identité de composition entre ces moûts, et ceux dans lesquels les levures de champagne doivent se développer à la sortie du pressoir. La température de 100°-105°, soutenue pendant vingt minutes, suffit pour en assurer la conservation, grâce à la réaction acide du milieu. J'ai utilisé également, malgré les réelles difficultés qu'elle présente, la filtration à la bougie, rendue presque impossible avec les moûts de beaucoup d'autres fruits, et même du chasselas de table, beaucoup plus chargés de produits pectiques.

La stérilisation discontinue par le procédé de Tyndall, à laquelle j'avais pensé, afin de dénaturer le moins possible les moûts par la chaleur, ne présente aucun avantage sérieux sur l'application immédiate de l'autoclave. A 58° comme à 100-105°, toutes les substances albuminoïdes du moût sont coagulées, et il est à remarquer que dès 50°, cette coagulation commence en produisant la clarification

parfaite du liquide. Un goût de cuit ou de confiture très prononcé se produit dans les deux cas. Comparé aux autres sucs de fruits, le moût de raisin contient une proportion relativement minime de matières albuminoïdes ; c'est ainsi que la chaleur détermine dans les moûts filtrés, il est vrai, à la bougie (1), un précipité que l'on peut évaluer à 30-40 centigrammes par litre ; dans les vins, ces substances commencent sans doute à être entraînées, presque en totalité, par les matières tanniques contenues dans les rafles.

La proportion du glucose peut varier de 14 à 18 grammes pour 100 ; l'acidité, de 0,7 à 0,9 grammes évalués en acide sulfurique, par un dosage acidimétrique ; mais il est facile de s'assurer que des variations, même très étendues, dans cette acidité, n'influencent qu'assez peu le développement de notre levure principale de Champagne. J'ai pu l'augmenter de plus du double, par addition d'acide tartrique, sans trop entraver la fermentation ; on sait que les bactéries sont infiniment plus sensibles à ces conditions d'acidité ou d'alcalinité.

2. — *Préparation des milieux de culture solides.* — Le fait bien connu dans la technique bactériologique, que la gélatine et la gélose destinées à solidifier les milieux liquides, ne peuvent supporter les substances acides, n'apporte cependant pas un obstacle insurmontable à la préparation des milieux solides présentant cette réaction. J'ai pu tourner la difficulté en mélangeant des gelées simples à la gélatine et à la gélose suffisamment chargées de ces principes, au liquide acide qu'il s'agit de solidifier, et en répartissant *immédiatement* dans les vases stériles destinés à la culture. Si l'on tentait de fondre

(1) On sait que les bougies filtrantes retiennent en quantité variable, par des phénomènes d'imprégnation mécanique ou de teinture, un certain nombre de substances ; parmi lesquelles, les matières albuminoïdes.

à nouveau ces milieux pour des transvasements, on s'exposerait à ne plus les voir faire prise.

Il est assez facile de confectionner des gelées de gélose à 3 p. %, et de gélatine à 20 p. %, ayant simplement l'eau pour base ; dès qu'elles sortent de l'autoclave, on y mélange deux à trois fois leur volume de moût, et l'on se hâte de préparer un certain nombre de boîtes de Petri et de tubes inclinés, qu'il est nécessaire d'avoir toujours en suffisante quantité sous la main pour un travail tel que celui-ci.

Les plaques de Petri à la gélose, que j'ai constamment employées pour mes premières séparations, se conservent assez longtemps sous une cloche préalablement stérilisée à la solution acide de sublimé au millième des laboratoires, et reposant dans un cristalliseur contenant un peu d'eau bouillie destinée à empêcher la dessiccation même partielle du milieu.

Il faut, en effet, éviter avec soin la dessiccation superficielle, et l'on se rend facilement compte de l'importance de ce détail en déchirant la surface d'une plaque ensemencée et en partie desséchée ; le plus souvent, les formes levure ne poussent que dans les endroits lésés. Aussi, j'ai pris pour règle de n'employer les plaques datant de quelques jours, qu'après en avoir lavé, au moment du besoin, la surface avec un peu d'eau stérilisée. On comprendra que la légère couche humide superficielle qui en résulte, place les organismes qu'on y dépose, dans des conditions analogues aux milieux liquides. Par ce moyen, on conserve les avantages de la séparation et de la numération, tout en atténuant beaucoup, dans tous les cas, l'inconvénient signalé et rapporté plus loin par M. Hansen [14].

On surveille la formation inévitable, à la longue, de quelques colonies de moisissures qu'il est nécessaire d'enlever au moyen d'un scalpel flambé, avant qu'elles n'aient formé

leurs spores, faute de quoi les plaques sont rapidement envahies et deviennent inutilisables.

Avec beaucoup d'inconvénients sur lesquels je reviendrai, la gélatine ne présente guère d'avantages marqués sur la gélose que j'ai presque constamment employée pour les premiers isollements ; les colonies, il est vrai, présentent des caractères de différenciation plus accusés ; on possède également, dans certains cas, le caractère de la liquéfaction, mais je crois à son instabilité pour une même race. J'ai pu voir, en effet, qu'une levure présentant les garanties désirables de pureté, c'est-à-dire ayant été soumise à un certain nombre de séparations en surface, perd souvent peu à peu ce caractère.

Dans tous les cas, les moisissures amènent trop fréquemment la perte d'une opération toute entière de séparation sur gélatine, par leur abondante sécrétion de diastases liquéfiantes. En ce point, il faut faire la remarque que ce sont principalement ces formes levure, désignées habituellement sous le nom de torulas, de levures sauvages, et ne jouissant que peu ou pas du pouvoir ferment du glucose, qui se montrent les plus liquéfiantes vis-à-vis de la gélatine. Ce milieu présente en outre le gros inconvénient d'être à peu près inutilisable pendant les chaleurs de l'été, au moment même où les éléments de travail se font plus abondants.

3. — *Pratique desensemencements.* — Il va sans dire que l'on ne peut pratiquer sur ces milieux que des ensemencements en surface. Pour cela, on promène à l'aide d'une pince flambée et refroidie, soit un grain de raisin que l'on fait adhérer successivement par tous les points de sa périphérie, soit un fragment de végétal quelconque ou de vigne. C'est ainsi que j'ai toujours opéré pour m'assurer des diffé-

rences qui peuvent exister dans la localisation des *Hematiium* sur les diverses parties du cep.

Si l'on s'agit d'une goutte de moût dont on veuille séparer les levures, on la dépose sur la plaque; elle est ensuite étalée sur toute la surface par le moyen d'une fine lame de platine très flexible, flambée et tenue à l'extrémité d'une pince. C'est du reste un procédé que j'ai depuis longtemps adopté dans la technique de la microbie pathogène. En étalant ainsi, strictement à la surface, une trace du produit soumis à la séparation des aérobies, au lieu de l'ajouter quand le milieu fondu est sur le point de se solidifier (en coulant aussitôt en plaques dès la répartition); on supprime les colonies de profondeur, dont l'aspect et l'état de développement diffèrent toujours des colonies de surface; et la technique en est d'autant simplifiée.

En mélangeant les échantillons par trop aqueux, de sable sec stérilisé au four Pasteur, on obtient de meilleurs résultats dans la numération. Il est facile de concevoir que l'on entrave, par ce procédé, le déplacement des microorganismes sur les plaques trop chargées de liquide.

4. — *Avantages et inconvénients de ces différents milieux* — Examinons à présent quelle peut être la valeur des milieux de cultures solides, moûts solidifiés par la gélatine ou mieux la gélose, que nous allons employer à la recherche des formes levure, et quelles sont les indications qu'ils peuvent nous fournir.

Dans son mémoire de 1890, M. Hansen [14] fait la remarque judicieuse, que les milieux additionnés de gélatine se prêtent difficilement à la végétation des formes levure affaiblies par l'hiver et par le temps en général. C'est parfaitement vrai, et j'ai pu maintes fois remarquer la valeur de cette observation; mais tous les bactériologistes

savent que la gélatine ne reste pas, comme la gélose, absolument inerte vis-à-vis des microorganismes se développant à la surface comme dans son intérieur. Des substances azotées, telles que la gélatine, constituent sans doute un aliment plus ou moins utilisable pour les bactéries; mais elles peuvent nuire beaucoup au développement des *Saccharomyces* et autres formes voisines, qui consomment surtout des hydrates de carbone solubles tels que les sucres.

En général, la gélatine ne doit être employée que pour la différenciation des races déjà isolées, par conséquent régénérées et en pleine vigueur. Il est à penser également que l'inconvénient inhérent à cette substance employée à la dose de 10 % comme solidifiant des mouls, est *considérablement atténué*, si on y substitue la gélose dont je me suis constamment servi, cette dernière substance n'entrant que dans la proportion de 1 % au maximum, et restant absolument inerte vis-à-vis des formes végétatives qu'on lui confie.

Du reste, pour résoudre expérimentalement une question aussi complexe que celle de l'importance relative à attribuer aux multiples provenances des *Saccharomyces* qui s'offrent à nous sur les nombreux substratum naturels, non seulement il ne serait pas mauvais, mais même très utile, de pouvoir séparer autant que possible les formes restant des années précédentes, de celles comprises dans le cycle annuel, et ces dernières ont fait l'unique objet de ma recherche. Je n'ai jamais visé dans mon travail la dissémination et la pérennité des *Saccharomyces*, telles que les comprend M. Boutroux (1); mais au contraire, ce qui se passe qualitativement et quantitativement sur le raisin, en ce qui concerne les formes annuelles, espérant y trouver un guide

(1) Sur la dissémination naturelle des levures de vin. Comptes-rendus Acad. Sc., 1893. T. II, p. 1036.

précieux et d'excellents renseignements dans la question de l'origine, le principal but de mes recherches.

§ II. — Étude sur le *Dematium pullulans* de la vigne

Il est peu de mucédinée sur laquelle on ait autant écrit que sur le *Dematium pullulans* De Bary; elle est l'objet d'une bibliographie considérable, et je ne veux encore rapporter ici que les choses essentielles, et les observations personnelles se rattachant à mon sujet. Depuis que M. Pasteur a appelé l'attention sur les ressemblances morphologiques incontestables qu'elle présente avec les vrais *Saccharomyces* (bien que dépourvue du pouvoir ferment du glucose), tous les efforts se sont en effet portés, plus ou moins directement, vers la vérification de la parenté supposée de ces deux organismes. Le mémoire de M. A. Joergensen [22] nous avait un instant fixé dans l'affirmative; mais celui de MM. Kloecker et de Schioenning est venu tout remettre en question, en apportant des conclusions contraires.

En tout cas, pour une recherche telle que celle qui nous occupe, il est absolument nécessaire de bien connaître cet organisme et la façon dont il se comporte, comme aussi l'aspect caractéristique de la colonie du *Dematium pullulans* que l'on trouve si abondamment, et souvent presque exclusivement sur les milieux de cultureensemencés au moyen des différentes parties de la vigne, et même d'autres végétaux.

1. — *Isolement et caractères des cultures sur milieux solides.* — Dès son apparition, la colonie ne se différencie guère de celle des *Saccharomyces* vrais; mais son aspect, bientôt plus étalé, devient rapidement translucide par une sorte de liquéfaction sur place. Examinée alors à l'aide d'un faible gros-

sissement et à la lumière directe, on aperçoit distinctement les filaments radiés caractéristiques que je décrirai plus loin, et si l'on n'était prévenu, on pourrait diagnostiquer de ce fait, sur les plaques, une colonie commençante de moisissure vulgaire. Au bout de 24-48 heures, ces filaments translucides sont parfaitement visibles à l'œil nu, et suffisent pour fixer l'observateur exercé.

Au moment de la floraison, la plupart de ces colonies prennent une teinte jaune gomme-gutte se développant surtout à la faveur d'un large accès de l'air, et à basse température. On n'observe guère cette teinte dans les tubes étroits, mais presque constamment à la surface des plaques de Petri, et il est remarquable qu'un certain nombre de colonies possèdent seules le pouvoir chromogène, les autres demeurant blanches ou incolores. Il s'agit cependant bien du même organisme, puisque toutes ces colonies réensemencées donnent la variété blanche; le pouvoir chromogène disparaissant très rapidement. Cette couleur jaune est donc spéciale à quelques colonies privilégiées à cet égard, et issues directement des organes verts,

Toutes ces colonies, sans exception, ne tardent pas à prendre, au bout d'une semaine environ, une teinte noire intense et uniforme comme chez quelques autres espèces de mucédinées. Pour les *Saccharomyces* que l'on conserve sur différents milieux de culture solides, et même sur du papier poreux stérilisé, par une méthode aujourd'hui assez fréquemment utilisée, on voit aussi apparaître une couleur noire, mais beaucoup moins intense, et au bout d'un temps infiniment plus long. Il en est de même du *Dematium pullulans* au bout de plusieurs mois, sur les milieux préparés avec des moûts artificiels. M. G. Bertrand, que j'avais prié de vérifier si le phénomène n'est pas lié à la présence de quelque oxydase analogue à celles dont on lui doit la découverte, a vu, en effet, le produit

de la macération de ces *Dematium* devenus rapidement noirs sur les moûts de raisins murs, bleuir franchement la teinture de Gayac [21].

On voit donc que cette coloration n'a rien de bien spécial au *Dematium pullulans* ; elle y est surtout accusée, et sa production est certainement favorisée par une substance inconnue entrant dans la composition des moûts de raisin mûr, même stérilisés à l'autoclave. La couleur caractéristique ne se développe pas, ou seulement très faiblement à la longue, si l'on fait usage comme milieu de culture, de moût de raisin vert, ou d'un moût artificiel solidifié. L'oxydase, dont dépend le développement de la couleur, serait propre à la plante, et sécrétée en quantité plus grande par le *Dematium* que par les autres formes levure.

Le *Dematium pullulans* secrète un mucilage abondant ; le moût dans lequel on l'ensemence prend rapidement une consistance visqueuse ; mais il est à remarquer que cette production de mucilage est singulièrement réduite dans les moûts à réaction très acide, tels que ceux de raisins verts, et j'ai mis largement à profit cette particularité, pour obtenir des cultures à peu près exemptes de cette matière. Lindner [13] a depuis longtemps montré que le moût de bière peut prendre une consistance mucilagineuse analogue, sous l'influence de la végétation de cet organisme.

Si l'on touche avec un fil de platine la colonie jeune, pour en prélever un échantillon à examiner ou à ensemen-
encer, la substance se laisse étirer en un long fil élastique qui est un premier indice du caractère mucilagineux de ses éléments.

Au lieu de reproduire indéfiniment, à la façon des vrais *Saccharomyces*, au moins dans les conditions ordinaires, des cellules dissociées semblables à elle-même, la cellule isolée du *Dematium* donne naissance à de longs filaments radiés, irrégu-

lièrement cloisonnés, et produisant de temps à autre, au niveau des cloisons, et par bourgeonnement, des collerettes de cellules dissociées à forme de levure. Celles-ci se multiplient à leur tour sur place et en grand nombre par bourgeonnement. Chaque collerette revêt alors bientôt le caractère d'une véritable colonie, d'où partent à leur tour de nouveaux filaments colonisateurs provenant le plus souvent du rameau initial. J'ai cherché dans la figure 1 A, à reproduire cet aspect aussi fidèlement que possible. Réense-

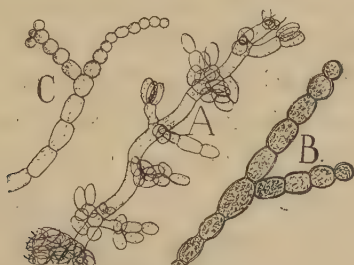


Fig. 1

A. Un filament jeune de *Dematium* sur milieu de culture solide (gélose au moût), formation des collerettes ; B, un filament de *Dematium* sur la culture en voie de dessiccation ; C, un filament de *Dematium* jeune (gélose au moût de raisin vert). (D'après des photographies de cultures).

mencés un grand nombre de fois, ces *Dematium* semblent perdre une partie de leur propriété de fournir des formes filamenteuses.

J'ai remarqué également que les milieux à réaction très acide, tels que le moût de raisin vert solidifié par la gélose, et sur lequel nous avons déjà constaté considérablement réduite la production du mucilage, sont particulièrement précieux, pour l'obtention de cultures présentant le moins possible de formes filamenteuses, avec le maximum d'éléments dissociés (C).

2). — *Développement en milieu liquide.* — Dans les moûts de raisin, le *Dematium pullulans* donne un dépôt pariétal d'apparence

cotonneuse, sans jamais troubler le liquide; un stroma membraneux et ondulé rappelant les cultures âgées de pénicilles, se forme ensuite à la surface.

3). — *Recherches sur la formation des spores.* — Pendant longtemps, j'ai cherché sans succès à provoquer la formation des spores chez le *Dematium pullulans*, en utilisant les procédés en usage pour les *Saccharomyces* vrais (procédé classique du bloc de plâtre, ou mieux de la plaque de porcelaine dégourdie) (1).

Les remarques précédentes, relatives à l'obtention facile des formes dissociées de cet organisme, constitué en grande partie par des filaments cloisonnés sur les milieux habituels de culture, m'ont permis de me placer dans les conditions habituelles de

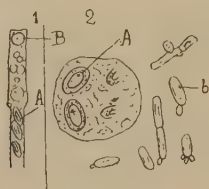


Fig. 2

l'obtention des spores des *Saccharomyces* vrais. J'ai pu réussir, de cette façon, à observer des formations non encore décrites, et je ne saurais mieux faire que de reproduire ici l'aspect obtenu après un séjour de huit à dix jours à 24-26° sur les plaques de porcelaine. On voit fig. 2, qu'à côté des cellules ayant conservé l'aspect habituel des formes dissociées du *Dematium* ou des *Saccharomyces* (b), il s'est formé des sortes de cellules géantes à contours peu définis. A l'intérieur de celle-ci, on aperçoit des corps ovoïdes réfringents (A), en nombre variable et non fixe comme

(1) On sait que les cellules jeunes sont seules aptes à donner des spores (Hansen).

chez les *Saccharomyces*, mais différant aussi de l'aspect habituel des spores de ces champignons, par une double membrane d'enveloppe bien évidente. Le peu de fréquence de ces cellules géantes, ne m'a pas permis de pousser plus loin l'étude des corps inclus, dont j'aurais désiré pouvoir observer la germination possible et la manière de se comporter vis-à-vis des colorants. J'ignore si l'on est en présence d'une sporulation véritable, analogue à celle des levures vraies ; mais j'incline à penser qu'il s'agit d'un phénomène différent. Cherchant à obtenir à nouveau ces formations endogènes, je n'ai réussi, en me plaçant dans des conditions en apparence identiques, à observer que deux de ces cellules géantes que je viens de décrire, et au bout d'un temps beaucoup plus long. Il est vrai que ce second essai a été effectué au commencement de novembre, dans la saison hivernale du *Dematium* ; mais nous restons loin de la régularité que l'on constate dans l'obtention des spores des *Saccharomyces* vrais, notamment en ce qui concerne le nombre de ces dernières, et le temps qu'elles nécessitent pour apparaître.

Autres formations endogènes des Dematium. — Si l'on examine des cultures de *Dematium* en moût de raisin, et plus particulièrement celles que l'on obtient en plaçant sous une lamelle le produit du lavage d'un grain de raisin vert par un peu de moût, on observe, aussi bien à l'intérieur des cellules dissociées que des filaments, des sphérules à contours très nets, apparaissant en clair sur la couleur plus grise du protoplasma. (B) (partie 1, de la figure 2).

En général, on trouve une de ces formations à l'extrémité de chaque article, et il semble que cet aspect représente la dernière phase de leur évolution ; car la plupart des cellules en renferment un très grand nombre *en voie de création*, avec des contours irréguliers, et des dimensions variables. L'examen microscopique le plus soigné ne révèle

aucune membrane propre, et l'action des matières colorantes, iode, vésuvine, vert de méthyle, les laisse parfaitement incolores. Ces premières formations sont, à n'en pas douter, des vacuoles déjà aperçues et figurées par tous les auteurs qui se sont occupés, non seulement des *Dematium*, mais aussi des autres champignons filamenteux ; elles sont particulièrement nettes chez le *Dematium pullulans*.

Tout récemment, M. Weleminsky [30] est venu mettre en lumière des faits semblant présenter de grandes analogies avec les observations précédentes. Cet auteur a observé, à l'intérieur des filaments d'un *Dematium*, des formations ovoïdes qu'il décrit comme des spores. Ces corps existent en grande quantité dans certains filaments, et seraient entourés d'une zone mucilagineuse. Pour vérifier leur nature de véritables spores, il manque, comme à mes observations rapportées précédemment, la connaissance de l'action spéciale des matières colorantes avec la résistance à une décoloration ménagée, et ensuite la preuve de leur germination. En me conformant aux indications de M. Weleminsky, j'ai pu obtenir quelques filaments porteurs de formations sans doute identiques à celles qu'il a décrites ; mais encore en nombre beaucoup trop restreint pour une vérification suffisamment complète des caractères propres aux véritables spores. La production de ces corps spéciaux nous apparaît donc aussi comme essentiellement accidentelle. On trouvera dans les planches annexées à ce mémoire, la reproduction photographique d'un de ces filaments dessiné aussi dans la figure 2 (1) (A). Au milieu des articles vacuolés, ce dernier nous apparaît comme plus chétif, et en faisant agir les colorants désignés ci-dessus, je me suis assuré que ces prétendues spores fixent la couleur avant le protoplasme. Peut-être convient-il de voir dans ce fait, un simple phénomène d'imprégnation superficielle lié à la présence d'une enveloppe mucilagineuse.

Le nombre de ces corps, dans chaque article qui s'en trouve

porteur, est aussi variable que pour les vacuoles contenues dans les articles contigus ; je n'ai pas réussi à les observer en liberté dans le liquide ambiant. Au lieu de véritables spores, je verrais peut-être de préférence, dans les formations de Weleminsky et dans ma propre observation de corps analogues obtenus sur plaques poreuses, la production de réserves azotées. Dans tous les cas, la fonction mucilagineuse que l'on voit se manifester parfois d'une façon très intense dans les moûts de raisin où végète le *Dematium*, doit rester complètement étrangère à la présence de ces formations spéciales ; c'est alors une production de la membrane cellulaire.

Autre production accidentelle du Dematium pullulans. — En observant des cultures âgées de *Dematium pullulans* renfermées dans des tubes à essais, mon attention a été attirée par des nodosités n'existant pas, à beaucoup près, sur toutes les colonies. J'ai reconnu que parmi les circonstances favorisant leur apparition, le principal facteur consistait en une dessiccation lente et progressive. L'examen microscopique, très gêné par la coloration noire et l'état compact de ces formations, m'a révélé qu'il s'agissait de sclérotés ayant les allures de débuts de périthèces. En suivant leur développement sur les stades les moins avancés, j'ai pu voir qu'un certain nombre de filaments se dirigent vers le même point, arrondissent et gonflent leurs cellules au fur et à mesure qu'ils se rapprochent. Ils s'enchevêtrent alors et semblent se fusionner en se comprimant mutuellement, de façon à former une sorte de sphérule, arrêtant malheureusement, par sa couleur plus intense encore que dans les filaments ordinaires, la lumière transmise, J'ai pu néanmoins, dans quelques cas, apercevoir au centre deux gros éléments allongés et comme associés en mors de pince ; mais je n'ai jamais

pu reconnaître la moindre spore, en cherchant à écraser ces formations spéciales. Comme il arrive constamment dans les cultures en tubes, les colonies isolées se trouvant sur les bords, là où l'épaisseur de la gelée est réduite au minimum et la dessiccation plus rapide, montrent à la périphérie, une couronne de ces sclérotés émanant de la colonie elle-même.

CHAPITRE II

NOUVELLES RECHERCHES SUR LE PROCESSUS DE L'APPARITION DES FORMES LEVURE SUR LA VIGNE ET SUR LE RAISIN

La première expérience que l'on peut réaliser dès le printemps, consiste à ensemer sur une boîte de Petri garnie de gélose au moût, le produit du grattage délicat au moyen d'un scalpel, du jeune bois de l'année précédente. Le microscope révèle dans ce produit, quantité de cellules aux aspects les plus variés, mais dans lesquelles on reconnaît des formes analogues à celles que l'on observe dans les vieilles cultures de *Dematium*, puis, semble-t-il, beaucoup de spores appartenant vraisemblablement à des espèces différentes. Au bout de 36-40 heures d'étuve à 22°, on constate le développement à peu près exclusif d'un grand nombre de colonies de moisissures où domine toujours le *Pénicillium glaucum*, et celles moins nombreuses d'un hyphomycète, blanches, opaques, à contours irréguliers. La surface de ces dernières devient rapidement crustacée, sans émettre

(1) Les échantillons destinés aux ensemencements ont tous été recueillis en plein vignoble, avec les précautions qui président à la récolte des virus, et enfermés dans des tubes stériles pour le transport au laboratoire. Les vignes de Champagne, par leur tenue irréprochable dans les grands crus, présentent, sous ce rapport, des conditions presque théoriques (vignes basses) qu'il serait difficile de rencontrer ailleurs, où les végétaux sont presque toujours mélangés.

les prolongements caractéristiques de la colonie du *Dematium*. Il m'est arrivé également d'isoler ainsi des *Saccharomyces* vrais. Du reste, j'ai pu m'assurer par l'exposition de nombreuses plaques de culture, qu'à ce moment de l'année, l'air du vignoble charrie, outre les moisissures vulgaires, beaucoup de germes de vrais *Saccharomyces* poussant parfaitement sur la gélose au moût.

Le passage de la saison d'hiver, sous nos climats, est donc impuissant à affaiblir suffisamment les germes des vraies levures, et entraver leur végétation sur les milieux solides.

Voulant me rendre compte de la façon dont le *Dematium* apparaît sur les jeunes feuilles, j'ai enfermé des rameaux où commençaient à poindre des rudiments de bourgeons, afin d'écarter de ma recherche l'hypothèse de l'origine aérienne de cet organisme, sur ce substratum en voie de développement rapide. Pour cet usage, des ballons de verre de deux litres furent employés à coiffer l'extrémité de rameaux taillés, et le col, tourné vers le sol, fut obturé par un gros tampon de coton. La connaissance de la physiologie la plus élémentaire de la plante commande nécessairement de garantir du soleil cette petite serre suspendue, sans quoi, le bourgeon qui se développe rapidement se trouve immédiatement grillé par la chaleur. En écrasant les jeunes feuilles au fond d'une capsule de platine flambée, et ensemençant le produit en surface, il est alors facile de constater que cette séquestration, en supprimant l'apport de germes de *Dematium* par l'air, n'a point empêché cet organisme venant du bois, et poussant ici avec les caractères décrits dans le chapitre précédent, d'envahir le bourgeon et les jeunes feuilles qui en procèdent.

Sur des bourgeons librement exposés à l'air, on peut encore se rendre compte de la façon dont sontensemencés les organes verts. Dans ce but, on enlève les portions externes d'un tout jeune bourgeon au moyen d'un rasoir dont on a soin de flamber la lame dès qu'elle a tranché l'échantillon, ou encore les jeunes

feuilles d'un bourgeon plus développé, avec une pince flambée. On constate, par la culture, que la portion interne, dans laquelle on distingue déjà la jeune inflorescence, reste constamment stérile.

L'examen microscopique direct des feuilles extérieures du bourgeon, bien que très gêné par un feutrage de poils laineux, montre un mycelium extrêmement grêle formé de longs filaments irréguliers, rarement cloisonnés, pourvus de renflements en hernies et de sortes de crampons fixateurs. Partout où ces filaments ont été enlevés, il en reste la trace à la surface de la feuille. Plus celle-ci avance en âge, et plus il est difficile, cela se conçoit pour de multiples raisons, d'y constater ce mycelium, et cependant on peut toujours s'assurer par des ensemencements, qu'à n'importe quel moment, le *Dematium* y pullule. De Bary, [1 et 9] Læw [2] ont mis en lumière sa grande diffusion sur toutes les parties vertes des végétaux; mais il est facile de se rendre compte, par les ensemencements de parties vertes d'autres végétaux à fruits sucrés, et largement pratiqués en surface, qu'il affectionne surtout la vigne.

On peut voir également que le tout jeune ovaire, au moment où se produit le départ du capuchon floral, est indemne de *Dematium*; mais qu'il est envahi à son tour avec une très grande rapidité. Pendant les premières semaines de son développement, le jeune fruit devient comme le lieu d'élection du *Dematium*; on l'y trouve toujours en très grande quantité et en culture pure.

Il est très intéressant aussi d'examiner sous quel état il se trouve sur ce nouveau substratum, et dans cette intention on enlève, au moyen d'un rasoir, de minces rubans que l'on examine de face au microscope. On voit alors le mycelium décrit ci-dessus, former des séries linéaires de trois ou quatre cellules renflées, à parois épaisses, et devenant rapidement noires, puis le filament primitif non cloisonné reprend sa course (1). J'ai observé

(1) Des formes analogues ont été figurées par De Bary [9].

également que ces filaments mycéliens donnent naissance à des pinceaux noirs de conidies bacilliformes, et ici encore, j'ai été averti de la formation de ces organes de dissémination, en constatant sur mes plaques destinées à l'analyse de l'air, une proportion inusitée de colonies. Si dans la suite, on examine dans les mêmes conditions la surface du raisin vert, on y trouve les conidies bacillaires et quelques-unes des cellules de conservation intercalées germant, et donnant naissance au fin mycelium non cloisonné. Nul doute que l'on ne soit en présence du *Dematium pullulans*, ce que démontrent d'ailleurs les ensemencements en surface.

C'est ici qu'il convient de nous demander s'il n'existe pas une connexion quelconque entre l'apparition de la couleur jaune de certaines colonies du *Dematium* (remarque de la page 15), obtenues sur les plaques par l'ensemencement des organes verts au voisinage de la floraison, et l'émission des conidies dont il vient d'être question, coïncidant avec la même époque. C'est qu'en effet, il serait intéressant de savoir si l'influence manifeste du substratum sur cette propriété passagère de produire une coloration déterminée, ne réside pas dans la production de ce nouvel état morphologique différent de l'état mycélien proprement dit. Il semble bien certain que par les ensemencements, on a du déposer sur les plaques de culture les deux éléments, mycelium et conidies, de la même espèce végétale. Nous verrons également que quelques jours avant la vendange, les ensemencements révèlent une nouvelle émission de conidies, et cette fois encore on voit apparaître, d'une façon moins marquée, il est vrai, mais néanmoins bien manifeste, la coloration jaune de beaucoup des colonies du *Dematium*. Il semble donc probable que les deux aspects observés sont en rapport génétique avec la production d'organes de dissémination, et que les colonies jaunes proviennent de l'ensemencement des conidies et non du mycelium lui-même.

Revenons un instant, également, aux résultats des ensemencements dont il a été question au début de ce chapitre, et provenant des portions externes de l'écorce de l'année précédente : nous constatons que quelques passages successifs sur la gélose au moût, ont suffi à leur donner tous les caractères extérieurs de celles du *Dematium pullulans*, dont elles ne diffèrent en rien dans la suite. A l'appui de ce fait qui semble de prime abord assez extraordinaire, je citerai les résultats de MM. Loew [2], Laurent [12], Cuboni [16], Janczewski [19], Berlèse [20], qui ont fait ressortir le *Dematium* comme une collectivité de formes.

J'avais pensé, tout d'abord, qu'il convenait de voir dans ce phénomène, l'influence d'un long séjour sur le milieu spécial constitué par le bois de l'année précédente pendant l'hiver ; mais sans abandonner complètement ce facteur, j'ai observé depuis, que les cultures de *Dematium* recueillies l'été possèdent une tendance très marquée, lorsqu'elles sont réensemencées l'hiver, à reprendre l'aspect crustacé ci-dessus. Dans cette variation saisonnière, peut-être faudrait-il voir, également l'influence de l'abaissement de la température sur des cultures ayant séjourné en dehors des étuves. L'hiver, il est presque impossible d'obtenir, même en faisant usage de moûts très fortement acides, une grande quantité de ces formes disséminées, que l'on se procure facilement l'été par ce procédé spécial.

Cuboni a aussi trouvé le *Dematium* dans la sève de la vigne, ce qui laisserait à supposer que cet organisme est un parasite interne ; mais les expériences que j'ai tentées pour vérifier ce fait m'ont donné des résultats négatifs. Tout d'abord, il n'est pas très facile de recueillir la sève du vieux bois sans la souiller par les portions externes de la tige, très chargée comme nous l'avons vu de germes de *Dematium*.

J'ai coupé, avec des ciseaux flambés, des entre nœuds choisis

les plus longs possibles, de grosses tiges de vigne en pleine végétation, et je les ai débarrassés des germes dont ils étaient porteurs extérieurement, en les plongeant quelques instants dans l'alcool absolu, opération suivie d'un grand lavage à l'eau stérilisée. En privant de leur écorce par surcroît de précautions, les échantillons affranchis de leurs extrémités au moyen d'un rasoir, comme dans les expériences relatives aux bourgeons, puis en ensemençant la portion interne restante écrasée aseptiquement dans la capsule de platine flambée, j'ai vu les cultures rester constamment stériles.

REMARQUES BIOLOGIQUES. — Les cultures en surface du *Dematium pullulans*, sur gélose au moût de raisin, obtenues au moment de la floraison par un temps convenable, et auxquelles nous avons vu prendre la teinte jaune rapportée ci-dessus, exhalent avec intensité l'odeur vanillée si caractéristique des fleurs de la vigne. Ce fait bien établi, j'ai émis en 1898 [28], l'opinion que l'odeur suave du vignoble pourrait bien être liée à la présence du *Dematium*, auquel nous voyons prendre à ce moment, à en juger par les ensemencements, un développement numérique considérable. Dans ce phénomène, j'ai vu encore se manifester l'influence d'un substratum aussi spécial que celui constitué par les organes floraux, sur un organisme tel que le *Dematium*, avec de la persistance odorante s'atténuant rapidement sur les milieux de culture. Dans une récente communication, Domingos Freire [31] est venu mettre en lumière des faits analogues. Cet auteur a montré que les cultures microbiennes provenant de fleurs odorantes, exhalent l'odeur de la fleur qui a servi à l'ensemencement.

À l'appui de la démonstration de cette influence du substratum, je crois pouvoir rapporter ici une autre observation relative à la sécrétion d'une matière colorante.

J'ai constaté que des colonies de bactéries acétiques, provenant

d'un vinaigre rouge de ménage, conservaient assez longtemps la propriété de donner des cultures rouges sur des milieux au vin blanc, et restaient longtemps blanches lorsqu'on les réenseménçait à plusieurs reprises sur des milieux au vin rouge. Enfin, je montrerai bientôt que l'aptitude que possèdent certaines levures récemment retirées du fruit de développer le bouquet dans les moûts, finit par se perdre, et cela très rapidement, pour quelques-unes d'entre elles, dans la conservation sur les milieux de culture.

Ainsi qu'on peut le voir par ces quelques faits rassemblés à dessein, l'influence du substratum naturel, ou même artificiel, sur les propriétés des organismes simples, échappe à l'observation quant à ses causes; elle se révèle seulement au dehors par des effets appréciables. Tout porte à croire qu'elle doit être liée à un certain nombre de facteurs, parmi lesquels nous avons vu les changements morphologiques. Il conviendrait sans doute d'y ajouter une aptitude nouvelle plus ou moins fugace à émettre des sécrétions cellulaires.

ESSAIS DE NUMÉRATION DES FORMES LEVURE SUR LE RAISIN. — Nous sommes arrivé au moment où le fruit des cépages rouges, choisis pour cet usage de préférence aux raisins blancs, afin de mieux juger du degré de maturité, commence à prendre uniformément de la couleur (véraison). Pour effacer ce que les ensemencements séparatifs avec les fruits peuvent présenter de particulier, il va falloir les multiplier, afin de se faire une idée plus précise de l'ensemble du phénomène étudié. La technique en a été décrite à la page 11. Commencées en 1896, ces expériences ont été répétées en 1897, et surtout contrôlées en 1898, favorisées par un temps exceptionnel pendant l'automne. Les années 1897 et 1899 ont été très pluvieuses au moment de la récolte, et celle de 1899, en particulier, a été accompagnée, au début, de véritables tempêtes.

Je suis arrivé à une confirmation pleine et entière de ce fait déjà signalé par Pasteur, et sur lequel est encore revenu tout récemment M. Martinand [25], que les fruits sont depuis longtemps rouges, et même avec toutes les apparences d'une maturité parfaite, sans cependant porter encore *trace de ces levures auxquelles est dévolu le rôle principal dans la fermentation industrielle du moût*. Ce point essentiel mérite quelques développements; le raisin est recouvert depuis plus d'une semaine de cette poussière veloutée qui est pour beaucoup le signe d'une maturité même assez avancée, *sans présenter encore à sa surface, autre chose que du Dematium*. A ce moment, commencent à apparaître les formes levures appelées levures sauvages, donnant seulement, ainsi qu'on s'en assure rapidement par l'ensemencement dans un tube de moût, un léger départ de fermentation qui s'arrête bientôt, et une végétation rapide en surface.

L'ordre chronologique de cette succession sur le fruit est à retenir; car, au moment précis de la vendange qui a lieu en Champagne à maturité très avancée, les ensemencements en surface vont nous déceler le mélange en proportions variables, des formes *Dematium*, *Torula* (1), levûres sauvages, et *Saccharomyces* vrais, ferments définitifs en infime minorité.

(1) Sous la dénomination de *Torula*, M. Pasteur avait cru devoir appeler l'attention sur des formes mycéliennes qu'il rencontrait sur les raisins, et présentant une série de renflements successifs. Cet aspect répond en effet au genre *Torula* (Link). Depuis cette époque, on a étendu cette appellation à des formes dissociées ressemblant aux levures vraies, sans posséder leurs propriétés biologiques. De nombreuses observations directes des formes levure, rencontrées à diverses époques, soit en place sur le raisin lui-même, soit dans le dépôt provenant de la centrifugation d'un peu d'eau ayant servi à leur lavage superficiel, m'inclinent également à penser que les cultures en surface de *Dematium*, de *Torula*, de *Levures sauvages*, peuvent dériver de formes analogues à celles observées et figurées comme *Torula* par M. Pasteur. Ces derniers ne seraient autre chose que des levures sauvages, à colonies formées comme elles, exclusivement de cellules dissociées bourgeonnantes, et donnant lieu également dans les moûts, à un départ de fermentation bien net, mais rapidement limité par une végétation en surface. D'une façon générale, nous n'observons, dans les cultures provenant directement des fruits, qu'une indication de la forme mycélienne, surtout développée sur les substratum naturels. La *Torula* développant une coloration

A ce moment, précédant de deux ou trois jours la récolte générale, j'ai établi parallèlement des expériences de fermentation, afin de contrôler les résultats de la technique des ensemencements en surface. Ces essais, effectués suivant la technique déjà employée par MM. Pasteur [5], Boutroux [8], Martinand [25], dans d'autres régions françaises, ne font ressortir que la rareté relative des bonnes espèces de *Saccharomyces* sur le raisin au moment de la vendange.

En écrasant avec les précautions nécessaires, au fond de vases stériles, des quantités de grains que je faisais varier depuis l'unité jusqu'à ceux qui composent une grappe toute entière, on voit le plus souvent rester sans fermentation le produit du foulage d'une certaine quantité de grains. Par un grand nombre d'essais, j'ai pu constater qu'en moyenne, ce n'est guère le plus souvent qu'en opérant sur cinq grains environ, que l'on pouvait compter sur une fermentation à peu près certaine. Dans le cas contraire, la surface du moût se couvre de moisissures qui consomment du glucose, et le tout reste en cet état. On comprendra, du reste, tout ce que de semblables essais peuvent avoir d'approximatif dans leurs résultats. On peut rencontrer un grain porteur de nombreux *Saccharomyces*, tandis que ceux qui composent une grappe entière, en seront complètement dépourvus. J'ai remarqué également que les grappes portant des grains minuscules, toujours beaucoup plus avancés en maturité, donnent à peu près à coup sûr des fermentations; je ne devais pas tarder à corroborer cette constatation, en poursuivant la série de mes ensemencements au moyen des raisins laissés intentionnellement sur les ceps après la récolte.

Telle est donc la puissance multiplicative de ces bonnes levures, ou si l'on veut, leur adaptation au milieu constitué par les produits dérivés du raisin mûr, qu'il suffirait d'une cellule sur une rose sur les cultures (*torula rose*), coloration propre seulement aux premiers passages à partir du fruit, est de beaucoup l'espèce la plus fréquente sur les raisins de Champagne, dans la période qui précède immédiatement la vendange.

proportion moyenne de cinq grains, pour assurer le résultat final de la fermentation. Cette dernière s'est opérée, en 1898, avec une régularité et une intensité que les viticulteurs champenois avaient rarement observées.

Il n'est pas sans intérêt de rapprocher de ces faits le résultat des observations météorologiques, dont l'intervention en ce point peut nous être de quelque utilité. J'ai déjà dit qu'en 1896, mais surtout en 1897, les mois de septembre et d'octobre ont été marqués par une température basse et par des pluies journalières régulièrement espacées. Il a fallu vendanger de très bonne heure; limités aussi dans leur développement par l'apparition d'une grande quantité de pénicilles à leur surface, les raisins n'ont pu arriver qu'à une maturité relative, et on a vu des cuvées entières rester sans fermentation. En gens avisés, les vignerons ont assuré leur fermentation, en ajoutant des lies de l'année précédente; car les *Saccharomyces* sont susceptibles d'une longue conservation dans les lies desséchées. Beaucoup d'entre eux ont interprété ces accidents, en disant que le lavage méthodique du raisin par la pluie avait entraîné la totalité des levures; on voit qu'à cette explication, sans doute très plausible, il faut surtout ajouter la maturité anormale par défaut de soleil.

Observations postérieures à la vendange. — Reste à suivre à présent, au moyen de la technique des ensemenagements en surface largement pratiqués, ce qui va se passer sur les différents organes de la vigne, et en particulier sur le fruit, à partir de la vendange jusqu'à l'extrême limite de la végétation de la plante. A cet effet, j'ai fait laisser dans le vignoble, quelques ceps absolument intacts, et j'ai suivi concurremment LE DEGRÉ DE FRÉQUENCE des *Dematium*, des *Torulas* et levures sauvages que je laisse en ce moment de côté, et surtout des vrais *Saccharomyces* ferments définitifs. Voici mes résultats :

Quand la feuille tombe naturellement du cep, elle est tou-

jours, comme au début de sa végétation, chargée des mêmes *Dematium* : par conséquent, normalement, *la feuille n'est jamais porteur, pendant tout le cours de son évolution, que de ces mêmes organismes*. Je n'affirme pas que par hasard, on n'arrive à isoler quelques levures, qui sont d'ailleurs, le plus souvent, des levures sauvages ; mais il faut considérer le caractère accidentel de cette constatation, pour ne voir que l'ensemble et la marche générale du phénomène.

Au moment de la récolte (12-15 octobre 1898), nous avons vu que chaque grain de raisin n'était pas forcément porteur d'une cellule de ferment alcoolique ; pratiquons à présent, tous les deux ou trois jours, desensemencements en surface jusqu'en plein mois de novembre.

Le 28 octobre, j'avais encore des ceps pourvus de tous leurs fruits, mis à l'abri, il est vrai, de l'atteinte des oiseaux. A *cette époque*, une certaine dessiccation se manifestait par de la flaccidité commençante ; les grains porteurs de pénicilles sont devenus de plus en plus fréquents, et il a fallu s'en débarrasser autant que possible pour éviter l'envahissement général.

Dès le 20 octobre, cinq jours par conséquent après la récolte, chaque grain *choisi sans aucune tare et parfaitement sain*, donnait sans exception, en même temps que des *Dematium* ainsi que des *Torulas* et des levures sauvages, un certain nombre de colonies de la levure définitive (1). Vers le 28 (toute cette période ayant été favorisée par un temps à souhait), j'ai pu, dans les mêmes conditions, compter sur chacune de mes plaques correspondant toujours à la flore d'un seul grain, une quarantaine en moyenne de ces bonnes levures (2), *en même temps que disparaissaient à peu près*

(1) Voir chapitre III.

(2) Voilà une notion qui est loin d'être inconnue du vigneron ; il sait fort bien que le transport des moûts dans les celliers des maisons de Champagne éloignées, ne se fait sans perte qu'au commencement de la vendange ; la fermentation se déclarant beaucoup moins rapidement qu'à la fin de la récolte.

complètement les *Dematium* et les *Torula* (1). Jusque vers le 3 novembre, les résultats n'ont guère varié que pour s'accroître davantage ; mais je n'ai jamais obtenu l'entière disparition des *Dematium* ; un seul grain m'en donnait trois ou quatre colonies, deux ou trois de *Torulas* roses ou de levures sauvages, et jusqu'à une soixantaine de colonies de levure définitive. Nous voilà loin du moment de la récolte, où les *Dematium* prenaient numériquement la place de ces dernières.

A partir du 4 novembre, j'ai observé une disparition très rapide des colonies de levure, et finalement, quelques jours plus tard, on n'obtenait plus guère, à part de grandes quantités de moisissures, que les quelques colonies de *Dematium*.

En résumé, nous voyons donc qu'en ce qui concerne la succession chronologique des organismes qui peuplent sa surface, on peut diviser l'histoire du raisin de notre vignoble de Champagne en trois parties assez distinctes :

1^o Une période s'étendant de la floraison à l'apparition de la couleur sur les cépages rouges, et pendant laquelle le fruit n'est porteur que de *Dematium*, en plus grande quantité. Cet organisme s'y rencontre toujours que sur le reste des organes de la plante ; ces derniers ne sont jamais d'ailleurs normalement porteurs que de ce même *Dematium*.

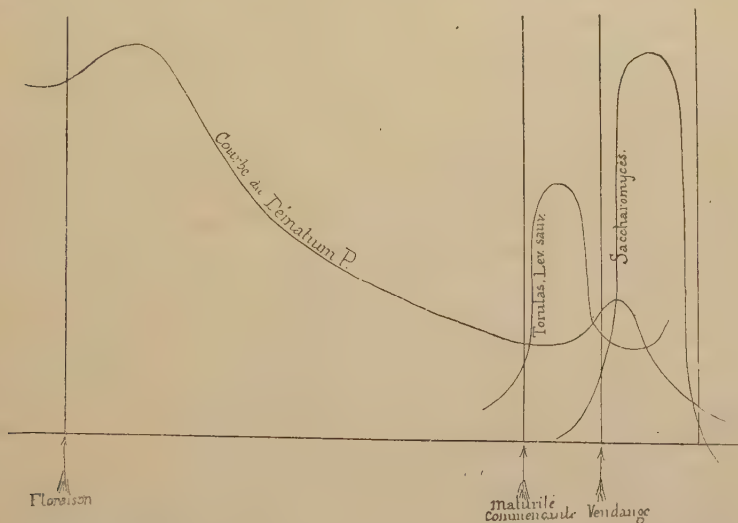
2^o Un intervalle d'une douzaine de jours où l'on trouve le mélange des *Dematium*, toujours en grosse majorité, des *Torula* roses, d'autres levures sauvages, et vers la fin, quelques *Saccharomyces* définitifs.

3^o Une dernière période, ou période des levures définitives, s'étendant de la vendange à la limite extrême de végétation, et pendant laquelle on voit décroître progressivement, mais d'une

(1) A cause des pluies et des vents violents qui ont précédé immédiatement en Champagne la vendange de 1899, les *Torulas* et levures sauvages ont été très rares sur le raisin. La levure vraie s'est également montrée beaucoup moins abondante qu'en 1898, et beaucoup de moûts sont arrivés dans les celliers sans présenter encore de départ bien net de fermentation.

façon très rapide, le *Dematium* sans cependant pouvoir en constater l'absence complète ; puis, à son tour, disparition de la levure (il ne reste que quelques *Dematium*, les pénicilles augmentent en général considérablement).

Les courbes de la figure suivante feront mieux ressortir ces faits.



L'ordre d'apparition des levures sur les autres fruits mûrisant avant le raisin, est-il calqué sur ce que nous venons d'étudier pour la vigne ? Telle est la question que l'on ne peut manquer de se poser en ce point de mes recherches. J'ai obtenu, en prenant pour sujet d'étude une baie sucrée se rapprochant autant que possible du raisin, des résultats des plus nets et des plus intéressants. Déjà, en 1897, je m'étais assuré que les baies rouges d'un groseiller à grappes situé dans le grand vignoble (1) de la montagne de Reims, et dont on négligeait de procéder à la cueillette des fruits, étaient porteurs de *Saccharomycès* vrais à leur maturité avancée, et cela plus d'un mois avant que le raisin ne prenne de la couleur. En 1898, je reconnus que ces

(1) Il est rare, en Champagne, de trouver cette condition réalisée.

mêmes *Saccharomycès*, que je recueillis en grande quantité lorsque le grain était devenu fortement ridé et avait perdu la majeure partie de son acidité, pouvaient être identifiés avec la levure principale de Champagne dont il sera question plus loin. Enfin, en 1899, je retrouvai ces mêmes levures ; mais tous mes efforts pour en isoler de groseillers éloignés des vignes et choisis en plusieurs endroits, furent absolument vains. A quelle cause peut-on rapporter ces résultats ? on l'attribuera à l'air spécial du vignoble, aux insectes si l'on veut, car nous sommes en pleine saison chaude, époque à laquelle ces animaux possèdent toute leur activité ; mais alors, pourquoi les groseillers éloignés du vignoble n'ont-ils pas été visités dans les mêmes conditions ? La complexité de tous les phénomènes biologiques m'interdit, pour l'instant, tout essai d'interprétation. Voilà néanmoins qui concorde avec cet autre fait général facile à constater : la grande rareté des *Saccharomycès* sur les raisins des treilles isolées et des serres, sur lesquels on ne rencontre le plus souvent que du *Dématium*.

Observations relatives au mode de dissémination des formes levure. — J'ai eu déjà l'occasion de faire remarquer la concordance existant entre les résultats des ensemencements en surface provenant directement des fruits, et les indications générales fournies par les cultures destinées à révéler la composition des formes levures charriées par l'air du vignoble. Voici, à ce sujet, le complément de mes premières expériences sur le *Dématium*. Après une période de pluie pendant laquelle les raisins se sont peu développés, les mois de septembre et d'octobre 1898 ont été favorisés par un temps à souhait ; mais la récolte n'a pu avoir lieu que du 12 au 18 octobre, par une température relativement très froide. Malgré l'attention la plus soutenue, on ne voyait voler aucun insecte autour des ceps. Au milieu de ceux-ci, j'avais installé, au commencement de juin, un petit abri en forme

de hangar à un étage, destiné à protéger de la pluie les plaques de culture qui devaient me révéler la trace des organismes charriés par l'air, et susceptibles de se manifester sur mes milieux de culture habituels.

M. Miquel a, depuis longtemps, montré qu'en toute saison, on peut isoler de l'air quelques *Saccharomyces*, à l'aide, il est vrai, d'appareils perfectionnés spéciaux, parmi lesquels il en est de fondés sur la mise en évidence par les milieux solides. Je m'attendais donc à en rencontrer constamment sur mes plaques ; mais je pensais quand même pouvoir saisir, par le nombre relatif des colonies de levures, la marche générale du phénomène, prendre sur le fait, s'il était possible, la *prétendue montée* de la levure au moment de la vendange.

Dès le mois de juin, quand les conditions météorologiques me semblaient favorables, chaque semaine environ, deux séries de plaques étaient déposées sur la plate-forme située sous le toit de mon hangar minuscule.

L'exposition à l'air commençait le soir, afin d'éviter, surtout l'été, une dessiccation par trop intense des milieux de culture.

Le lendemain matin, les plaques étaient recouvertes et transportées au laboratoire. Jusqu'au 12 octobre, je n'ai réussi qu'à recueillir des moisissures, parmi lesquelles, toujours en grande majorité, des colonies de Pénicilles et quelques colonies de *Dematium*. Quelquefois, j'ai trouvé de petits insectes attirés et retenus par la matière sucrée. Dès le 12 octobre, j'obtiens deux plaques où l'on voyait toujours les Pénicilles en majorité, mais cette fois, de très nombreuses colonies de *Dematium*, et une dizaine au moins de colonies de véritables *Saccharomycès* ferments C'est la seconde fois que nous voyons le *Dematium* abandonner à l'air des conidies en plus grande quantité que de coutume ; mais il est à remarquer qu'à présent, ils sont véhiculés conjointement avec des *Saccharomyces* vrais. A partir de ce moment, la proportion de colonies de ces *Dematium* diminue

considérablement sans cependant devenir nulle. Jusqu'au 1^{er} novembre, j'ai pu répéter cinq ou six fois la même expérience, et le 28 octobre (1), j'ai même obtenu des plaques beaucoup plus chargées de *Saccharomyces* ; ces derniers ont ensuite complètement disparu.

Le transport par l'air semble donc être un facteur important de dissémination des formes levure en toute saison [28]. On sait que M. Boutroux [8], en France, et surtout depuis Am. Berlèse [18], en Italie, ont aussi mis en évidence le rôle des insectes dans la dissémination et le transport des *Saccharomyces* sur les végétaux, et en particulier sur les fruits mûrs où ces animaux sont attirés par le glucose (2). Mais si le climat italien permet une grande activité de toutes sortes d'insectes au mo-

(1) On remarquera que cette date correspond à peu près avec la disparition assez brusque des levures qui se trouvent alors en grande quantité sur les raisins, ainsi qu'il ressort des expériences directes d'ensemencement.

(2) Un certain intérêt s'attache aux observations relatives au Lérot commun (*Myoxus nitella*), dont j'étudiais fin septembre, au milieu de leur période d'activité, la réceptivité à certains virus, et dont il est facile de se procurer à cette époque de nombreux exemplaires vivants. Ce frugivore hibernant jouit à ce moment de l'année d'un très grand appétit ; il possède la fâcheuse habitude de goûter à la plupart des fruits d'un verger sans en achever aucun, n'absorbant que les parties superficielles et par conséquent les plus mûres, c'est-à-dire celles qui portent les *Saccharomyces*. Son contenu intestinalensemencé fournit de très nombreuses levures que l'on peut rapporter à l'espèce dominante que l'on isole des cuvées champenoises, et dont le pouvoir ferment m'a semblé considérablement exalté.

Mais ce qui est non moins curieux, c'est que le *Dematium* est complètement absent de ces cultures. D'après les notions qui nous sont acquises, il est cependant bien certain que l'animal a dû en absorber davantage que de vrais *Saccharomyces*. Ce champignon a sans doute disparu comme il disparaît de la cuvée en fermentation ; il faut sans doute voir dans ce phénomène l'influence des sucs digestifs agissant comme antiseptiques ; car il est facile de s'assurer que le *Dematium* est bien moins résistant à ces agents que les bonnes levures. Il est donc dans tous les cas possible, pour se procurer des levures de fruits à énergie fermentative exaltée, d'aller à coup sûr les chercher dans l'intestin des Lérots, et il était intéressant de savoir si elles s'y conservent avec leurs propriétés, tout le temps que dure l'hibernation. Or, après trois mois de sommeil, on retrouve dans le contenu intestinal, des levures à parois considérablement épaissies ; mais il est impossible d'en obtenir des cultures par ensemencements dans les mouls sucrés.

ment de la maturité, et sans doute également, mais en proportion moindre, celui de la Sologne en année moyennement chaude, on a vu qu'en Champagne, contrée située, comme on sait, à la limite extrême de culture de la vigne en plein champ, il n'en était pas toujours ainsi.

CHAPITRE III

ÉTUDE SUR LA FERMENTATION PRINCIPALE DES MOUTS DE CHAMPAGNE.

Les moûts industriels de la Champagne, les seuls dont il soit question ici, proviennent de raisins blancs ou noirs ; destinés à donner des vins parfaitement blancs, ces raisins sont pressés légèrement, et séparés aussi rapidement que possible des rafles. Parmi les formes levure peuplant la surface du raisin au moment de la vendange, et dont nous venons de faire l'étude, les *Dematium*, *Torula*, Levures sauvages, très aérobies et donnant à peine un commencement de fermentation alcoolique, viennent former un magma brunâtre à la surface, dès les premières heures, et sont rapidement éliminés. Sous l'influence des vrais *Saccharomyces*, le moût ne tarde pas à entrer en fermentation vigoureuse, en prenant une teinte uniformément jaunâtre. A cause du bouquet, cette fermentation s'achève lentement, à basse température, dans les semaines qui suivent.

Afin de comparer entre eux les principaux crus de la Champagne, se groupant autour de Avize, Ay, Bouzy, Verzenay, et Villedommange, j'avais cherché, aux vendanges de 1897 et de

1898, années qui ne se sont guère ressemblées au point de vue météorologique, à collectionner les espèces de levures jouant un rôle actif dans la fermentation des moûts de ces provenances, Le but que je me proposais était de rechercher, dans les différences organoleptiques constatées entre les produits de ces différents crus, quelle part peut être attribuée tout d'abord aux circonstances diverses de la fermentation, et ensuite à la composition des moûts eux-mêmes,

Il fallait donc étudier, après séparation convenable en surface, sur des milieux au moût de raisin à la gélatine, les colonies provenant de l'ensemencement d'échantillons prélevés dans les meilleures cuvées en pleine fermentation. La gélatine est ici préférable à la géllose, pour la différenciation proprement dite. Je me suis aperçu très rapidement qu'une race du *Saccharomyces ellipsoïdeus*, fort probablement unique, tient le rôle principal dans les fermentations des moûts de Champagne. C'est tout au plus si une étude minutieuse m'a révélé, en quantité suffisamment importante pour être prise en sérieuse considération, dans les cuvées d'Ay, principalement en 1897, et ensuite de Verzenay, des races très voisines, sans doute dérivées, et ne différant de la race type que par quelques propriétés, du reste assez peu marquées, touchant l'état physique des dépôts laissés au fond des vases.

Voici tout d'abord l'énumération des principaux caractères de la levure type de Champagne :

a). En surface, sur gélatine au moût de raisin, colonies en perles saillantes, très blanches, ressemblant à un frottis de suif ou d'acide stéarique, ne se colorant en brun qu'au bout d'une longue exposition à l'air et à la lumière. La colonie isolée s'enlève facilement toute entière lorsqu'on la touche ; elle se dissocie comme du sable dans une goutte de liquide.

b). Trouble à peine le moût, qui s'éclaircit toujours très rapidement ; donne immédiatement naissance, dans ce liquide, à

une fermentation énergique très complète, et tombe de suite au fond du vase comme un précipité lourd, sans s'attacher aux parois. Ne forme jamais, (du moins au bout d'un certain temps de séjour dans les liquides), de voile ni de réseau mucilagineux.

c). A l'examen du moût dans la première fermentation, elle est constituée par de grosses cellules elliptiques presque rondes, assemblées par groupes de trois ou quatre, présentant souvent une grosse vacuole. Dans les cultures âgées, les cellules deviennent quelquefois parfaitement rondes, en prenant des parois plus épaisses.

d). Elle forme ses spores en 70 heures, à la température de 22°, sur plaques de porcelaine déglacée.

Les races les plus caractéristiques de cette espèce type m'ont semblé en différer surtout sur les points suivants :

Cultures plus étalées, plus poisseuses, plus adhérentes sur gélatine, devenant plus rapidement brunâtres, s'attachant sensiblement aux parois du vase en donnant un enduit légèrement gras, fournissant parfois de petits grumeaux caséux, subissant, assez légèrement il est vrai, la dégénérescence mucilagineuse. Elles exhalent une odeur moins vanillée, plus butyrique.

Au point de vue pratique, c'est dans la différenciation toujours délicate de ces races (1), qu'il conviendra de s'exercer par des expériences de fermentation bien conduites et comparables entre elles.

On utilisera avec profit la formation des voiles, des réseaux, l'aspect des dépôts dans le moût, et dans divers liquides sucrés artificiels etc., (2).

(1) C'est ainsi que ces races secondaires forment leurs spores en des temps sensiblement égaux à celui qui est nécessaire à l'espèce type ; elles se montrent également beaucoup plus réductrices vis-à-vis de la matière colorante des moûts de raisin.

(2) Voici la formule d'un de ces liquides, dans lequel la levure type donne une fermentation complète, et que l'on peut se procurer parfaitement limpide.

Saccharose, 125 gr. Phosphate d'ammoniaque, 15. Tartrate double d'ammoniaque et de potasse, 8. Crème de tartre, 5. Sulfate de magnésie, 1. Bouillon peptoné, 15 cm. Eau, 900. Chauffer à 115°. Filtrer chaud. Stériliser et répartir en ballons.

Si l'on ne considèrait que le pouvoir ferment proprement dit, on voit que les différences organoleptiques entre les crus d'une même région, ne seraient que sous la seule dépendance de la composition des moûts, en rapport par conséquent avec la nature du sol, du cépage, les conditions climatériques, le degré de maturité, etc, etc...; mais il faut tenir compte des propriétés particulières des *Saccharomyces* déterminant la fermentation de ces moûts, sans doute liées aux mêmes circonstances.

Nous avons eu l'occasion de montrer (page 28) que les microorganismes acquièrent des propriétés en rapport avec la

De nombreuses recherches sur les dépôts laissés dans les bouteilles, après la prise de mousse (1), m'ont démontré que c'est encore la levure type qui joue le rôle principal dans la seconde fermentation; je l'ai retrouvée parfaitement vivante après deux années de contact avec du vin chargé de gaz carbonique, sous la pression moyenne de cinq atmosphères.

Deux fois, cependant, j'ai trouvé, mélangée à la levure principale, une espèce elliptique allongée, donnant sur gélatine des colonies nummulaires, écailleuses et grisâtres. Ce fait, joint à quelques constatations semblables sur des vins de cuvée prélevés après l'hiver, nous montre qu'à côté de la levure principale, d'autres levures provenant du raisin et que j'ai considérées comme sauvages, en faisant remarquer toutefois, que quelques-unes peuvent donner lieu à des fermentations sérieuses, développant même un bouquet très fin, sont trop souvent entraînées dans la fabrication, et viennent juxtaposer leurs effets à ceux de la levure type. Il suffit, en effet, qu'une décantation imparfaite ait laissé quelques lies se mélanger au vin limpide surnageant. Il est bien certain, qu'en dehors des maladies purement microbiennes du vin (tourne, grasse, etc...), les accidents connus sous le nom de masque, sont liés en très grande partie à la présence de ces espèces secondaires, et probablement aussi, dans de moindres proportions, aux races dérivant de la levure type ou principale, et dont j'ai parlé ci-dessus. Il est facile de constater qu'en vieillissant dans les cultures, toutes ces levures accessoires subissent plus ou moins, à la longue, la dégénérescence mucilagineuse que l'on observe, par exemple, dans la formation des réseaux.

Les faits qui viennent d'être exposés nous montrent aussi que dans cette épreuve constituée par un long séjour dans du vin, sous pression de gaz carbonique, quelques espèces, parmi les levures accessoires, sont privilégiées et résistent autant que la levure principale; sous ce rapport, il est probable que l'on pourrait observer toutes les transitions entre la résistance de cette espèce principale, et celle du *Dematium pullulans* susceptible cependant de se développer dans les moûts, et que l'on ne retrouve même plus au début de la première fermentation. Au point de vue pratique, je pense que l'on peut conseiller de s'assurer par des séparations convenables, que la cuvée ne contient au tirage que la levure principale en majorité, et, dans le cas contraire, ajouter cette dernière espèce, afin de paralyser l'action des levures accessoires.

(1) Voir à ce sujet: J.-A. Cordier, L'état actuel de l'industrie des vins de Champagne *Revue générale des sciences*, Carré, édit., n° 3. 15 février 1899; j'expose dans cette publication les particularités biologiques les plus intéressantes de la fabrication des vins mousseux.

Etude sur la seconde fermentation des vins de Champagne. *Revue de viticulture*, juin 1899.

nature de leur substratum naturel ; mais le plus souvent nous ignorons complètement quels sont les rapports existant entre le microbe et son support. L'unité spécifique des *Saccharomyces* n'entraînerait pas nécessairement l'identité absolue dans le résultat final de la fermentation.

Il ne semble pas que l'emploi des levures sélectionnées en Champagne, ait donné les résultats attendus, et parmi les nombreuses expériences qui ont été tentées, j'ai cru voir dans les exceptions à leur actif, des succès se rapportant plutôt à des fermentations bien régulières, obtenues à côté de fermentations languissantes, comme celles que l'on a pu observer dans les années pluvieuses ou à maturité incomplète, en 1897 par exemple.

Le bouquet si intense et si caractéristique des vins de Champagne constitue leur propriété organoleptique la plus précieuse ; c'est donc dans la fermentation des moûts de provenance champenoise que l'on peut se rendre le plus facilement compte du rôle des *Saccharomyces* dans la genèse de ce bouquet. J'ai remarqué que l'emploi de cultures en larges surfaces, telles que celles que l'on effectue dans des boîtes de Petri garnies de gélose ou de gélatine au moût de raisin, pour la séparation ou la différenciation des espèces, est excellent pour l'appréciation rapide du bouquet fourni par les levures de vin, et ce procédé m'a permis d'en réaliser une sorte d'analyse. Dans ces conditions, toute production sensible d'alcool se trouve écartée, et il semble que le développement du bouquet soit favorisé par l'action de l'oxygène. Je suis arrivé à constater et à distinguer nettement dans le bouquet des vins de Champagne, un assemblage de deux groupes principaux d'odeurs différentes : 1° l'odeur vineuse, douce et peu aromatique ; 2° le parfum proprement dit, très pénétrant. Voici quelques essais de 1898 :

Expérience A. Si l'on ensemence en surface la levure principale, comme il a été dit, *quelques jours, ou même quelques semaines* après l'avoir isolée des meilleures cuvées, le bouquet caracté-

ristique complet se développe rapidement, et se manifeste d'une façon excessivement intense à l'ouverture du vase de culture (1) ; il disparaît graduellement au bout de cinq à huit jours, et l'on ne constate plus que l'odeur vineuse qui finit, à son tour, par disparaître au bout d'un temps plus long.

Expérience B. Le moût de raisin peut être remplacé par du moût de pommes, bien que le bouquet soit un peu moins fin.

Expérience C. Le moût de raisin ou de pomme, stérilisé à 115° à l'autoclave, donne les mêmes résultats qu'en A.

Expérience D. Les expériences précédentes, répétées en remplaçant les moûts végétaux par un liquide sucré artificiel (2), ne donnent lieu qu'à la production de l'odeur vineuse ; il suffit d'ajouter du moût de raisin ou de pommes pour faire apparaître le parfum complémentaire du bouquet.

Expérience E. Pendant les quelques mois qui suivent la vendange, on peut répéter facilement les expériences précédentes, en remarquant toutefois une diminution progressive dans la production du parfum qui s'affaiblit graduellement ; enfin, après cinq à six mois, on ne peut plus guère constater que l'odeur vineuse. Le procédé de conservation n'est pas absolument indifférent ; mais, bien que le résultat final soit identique, cette disparition m'a semblé plus rapide pour la levure conservée à la surface des milieux solides, que lorsque cette dernière est abandonnée au fond des vases où elle a pris naissance, ou dans l'eau sucrée.

A la suite de ces expériences, nous pouvons formuler les con-

(1) Le laboratoire où l'on réalise ces cultures est absolument saturé de ce parfum, si bien qu'une personne non prévenue exprime, en y entrant, l'idée que l'on vient d'ouvrir des bouteilles de champagne des meilleurs marchés. De plus, si l'on distille une certaine quantité de vin très bouqueté en se servant d'un réfrigérant de verre, on observe avant tout passage de liquide, que le tube s'emplit d'un nuage odorant ne se condensant pas à la température ordinaire. Ce nuage apparaît et disparaît en quelques instants, et il est facile de se rendre compte que l'alcool retiré ensuite n'est plus chargé que de l'odeur vineuse proprement dite.

(2) Composition du milieu artificiel de la page 42.

clusions suivantes : *il existe à la maturité, dans les moûts de raisin ou de pommes* (1), *une substance ou un groupe de substances résistant à la température de 113°, et constituant, avec la levure principale RÉCEMMENT RÉCOLTÉE SUR LE FRUIT, les facteurs essentiels de la production du bouquet.*

En dehors du pouvoir ferment qui semble rester constant, l'aptitude à la production du parfum exquis et pénétrant qui a fait la fortune des vins de Champagne, est donc une propriété relativement fugace, présentant son maximum d'action dans les jours suivants la vendange, pour aller progressivement en s'affaiblissant jusqu'à disparaître (2).

Il nous est possible de préciser l'origine de cette aptitude. En effet, parmi les nombreuses levures, plus ou moins sauvages, que j'ai isolées sur le raisin aux vendanges de 1897 et de 1898, il en était plusieurs fournissant, dans des conditions identiques à celles qui viennent d'être exposées pour la levure principale, un bouquet de Champagne vraiment délicieux. L'une d'entre elles, presque bacilliforme, était remarquable par ses dimensions restreintes ; mais principalement par l'intensité du parfum qu'elle communiquait au moût peu de temps après son isolement. Végétant immédiatement en voile, elle n'était susceptible de fournir ainsi que 1/2 0/0 environ d'alcool, et perdait sa propriété odorifère au bout de deux ou trois semaines (3).

(1) J'ai pu voir que la levure principale, régénérée de dépôts de dégorgement et datant de plusieurs années, devient absolument incapable de développer autre chose que l'odeur vineuse du bouquet. Du reste, j'avais déjà remarqué que le bouquet total ne s'accroît que médiocrement dans la seconde fermentation ou fermentation en bouteilles. Il faut ici tenir compte du développement et de l'amélioration apportés par le vieillissement et le gaz carbonique, jouant le simple rôle de véhicule, ou faisant partie intégrante du bouquet par sa propre fonction éthérifiante.

(2). — Les moûts de cerises et de groseilles (groseiller rouge à grappes), de fraises d'oranges douces, ne contiennent pas cette substance ; additionnés de glucose, on constate, surtout pour la cerise, le faible développement par la levure de champagne, d'un parfum absolument étranger à celui du vin, et rappelant l'odeur des préparations habituelles de ces fruits. La sève de vigne, traitée dans ces conditions, ne donne lieu à la production d'aucun bouquet.

(3) J'ai constaté dernièrement, par les méthodes qui viennent d'être exposées, que les levures recueillies dans les meilleures cuvées de 1889, ne pouvaient déve-

Les conséquences pratiques de cette observation semblent fort importantes. Puisque le parfum des vins tire son origine, non seulement de la levure principale, mais aussi des *Saccharomycès* que nous avons appelés sauvages ; la partie la plus délicate de ce parfum pouvant provenir d'espèces ne jouant qu'un rôle effacé dans la fermentation alcoolique, notre intérêt sera de laisser tout d'abord se développer ces espèces sauvages, autant que pourra le permettre la végétation de la levure principale. En d'autres termes, cette observation fait bien ressortir l'erreur biologique à laquelle on s'expose, en ajoutant immédiatement, au sortir du pressoir, une grande quantité de levure principale provenant des récoltes précédentes. On paralyse de la sorte, l'action il est vrai fugace, mais nullement négligeable des *Torula* à bouquet, venant, contrairement à la levure ajoutée artificiellement, de subir l'action du substratum naturel. On obtient ainsi un vin ne laissant rien à désirer au point de vue de la vinosité et de la façon dont il se compose dans la suite vis-à-vis des ferments de maladie ; mais manquant absolument de bouquet, c'est-à-dire de finesse. La question de l'emploi des levures sélectionnées en vinification, nous apparaît ici avec la complexité habituelle des phénomènes biologiques. L'emploi de la levure principale sera seulement indiqué dans le cas, assez fréquent d'ailleurs, de fermentations dont le départ par cette espèce provenant du fruit de l'année, ne se prononcera pas suffisamment au bout de quelques jours.

Dans l'état actuel de nos connaissances, tout porte à croire que cette propriété odorigène consiste dans une aptitude passagère à fournir quelque sécrétion diastasique (1), de nature à

lopper que très peu de parfum, comparativement à celles de même provenance en 1898. Cette remarque a été confirmée dans les grandes maisons de Champagne où fermentent des milliers d'hectolitres de moût. Il y a de la vinosité ; mais très peu de parfum, et l'on accuse les dernières circonstances climatiques ayant précédé la vendange. Ainsi apparaît encore manifestement l'influence du substratum naturel sur les qualités des levures.

(1) D'où la vieille coutume non dépourvue de risques (graisse, tourne), chez les

provoquer le dédoublement de la substance que nous avons vu se manifester dans les moûts. L'idée de cette supposition, il est vrai toute gratuite, mais que réclame l'interprétation de tout phénomène nouveau et encore entouré d'obscurité, repose sur l'observation de réactions analogues à celles dont nous possédons déjà de nombreux exemples devenus classiques dans la biologie végétale. Cette aptitude aurait pour origine l'état particulier de maturité du fruit.

En ce qui concerne la substance génératrice elle-même du bouquet, il faut rapprocher de ces expériences, les récents résultats obtenus par M. Jacquemin (1), qui a trouvé dans les feuilles du pommier et de la vigne, des glucosides fournissant par dédoublement dans la fermentation alcoolique, un produit aromatique caractéristique du fruit lui-même. S'il y a identité entre ces principes et la substance génératrice du bouquet que nous avons vu se manifester dans les moûts, cette dernière s'élaborerait dans la feuille, d'où elle passerait ensuite dans le fruit. Il est remarquable que certains vignerons ont eu, autrefois, l'habitude d'ajouter des feuilles de vigne à leur vendange; le sulfatage a complètement fait cesser cette coutume.

L'ensemble de ces faits donnerait, comme on le voit, une explication des insuccès auxquels ont donné lieu, chez beaucoup de viticulteurs, l'emploi de levures sélectionnées retirées *forcément* du fruit depuis une année au moins.

En ce qui concerne le patrimoine de la Champagne, située comme on sait à la limite extrême de la culture de la vigne en plein champ, on peut, pratiquement, conclure que tant que l'on ne sera en possession d'aucun procédé capable de conserver intégralement à la levure principale sa fonction

fabricants qui tiennent avant toute chose au bouquet, de laisser les vins « sur lies » jusqu'en décembre.

(1) *Comptes rendus*, Acad. Sc. 6 février 1899.

odorigène (1) qu'elle tient du fruit dans les bonnes années, il sera impossible, à moins que de les congeler au sortir du pressoir dans un but de conservation, de communiquer à des moûts plus précoces de provenance méridionale, et d'une valeur commerciale réduite, des qualités olfactives les rapprochant des crus champenois. Peut-être pourrait-on tourner cette difficulté en favorisant, par la chaleur et des soins spéciaux, le développement de quelques ceps qui donneraient ainsi une cuvée précoce; mais, à cause des conditions climatiques différentes, nous ne savons pas si la levure que l'on se procurerait par ce procédé, soumise ainsi à une sorte de genèse anormale, serait en possession des qualités spéciales si délicates que nous venons de mettre en évidence. Pour les régions situées au nord d'Avize, par où commence généralement la vendange en Champagne (2), il sera cependant relativement facile, dans les quelques jours séparant les récoltes diverses, de préparer des levains véritablement actifs et efficaces.

En attendant, il est bien certain que la levure principale de Champagne, dont les caractères ont été exposés ci-dessus, peut néanmoins rendre de grands services dans le cas de fermentations languissantes, et surtout pour la seconde fermentation (3) ou moussage en bouteilles, opération à laquelle le développement du bouquet reste étranger. J'ai pu m'assurer, en effet, que cette levure possède des qualités précieuses pour la manutention, fournissant un dépôt peu volumineux, sec et non adhérent.

(1) Lorsque, comme en 1898 et non en 1899, la maturité s'est effectuée doucement, sans à coup, en laissant aux *Saccharomycès* le temps de subir l'influence du raisin.

(2) La levure principale de Champagne retirée des cuvées provenant des raisins blancs de la région d'Avize, m'a semblé bien préférable, au point de vue de la finesse et de l'intensité du bouquet qu'elle est susceptible de développer, à la levure des autres crus champenois récoltée dans les mêmes conditions.

(3) Etude sur la seconde fermentation des vins de Champagne. *Revue de viticulture*, mai 1899.

Dans l'état actuel, la fabrication des cidres peut retirer les plus grands bénéfices de l'emploi des levures de Champagne tout récemment sélectionnées; elle a lieu en général en novembre, et les quelques fermentations que j'ai réalisées dans ces conditions sur les moûts de pommes, m'ont donné des résultats excellents; fermentation complète, clarification rapide, bouquet entièrement comparable à celui des vins champenois. C'est principalement dans cette fermentation des cidres, que l'on peut juger de toute la puissance productrice de parfum de la levure de Champagne. J'ai pu m'assurer également qu'à volume égal, les moûts de pommes sont susceptibles de fournir un poids de levure supérieur à celui que l'on obtient avec les moûts de raisin, sans doute à cause d'une proportion plus forte d'acide phosphorique.

CHAPITRE IV

ESSAI SUR L'ORIGINE DES SACCHAROMYCES

Après avoir constaté qu'il existe des ressemblances « incontestables » entre certaines formes dépourvues du pouvoir ferment vis-à-vis du glucose, et les *Saccharomyces* proprement dits, M. Pasteur émit l'opinion que ces derniers que l'on ne rencontrait jamais qu'à l'état de cellules dissociées, pourraient bien ne constituer qu'un état particulier de champignons filamenteux présentant également des formes dissociées, telles par exemple que le *Dematium pullulans* qu'il trouvait en abondance sur les raisins. Ainsi prit naissance l'hypothèse (1) de la descendance, et pour la vérifier, M. Pasteur imagina une expérience restée classique. On savait déjà, et dans les « Etudes sur la bière » ces notions furent précisées, que les levures n'apparaissent sur les fruits et les raisins en particulier, qu'à l'époque de leur maturité; c'est le phénomène connu de nos vignerons, sous le nom de « montée de la levure », et dont nous avons complété l'étude dans le chapitre II.

(1) Fortifiée depuis par la théorie de la collectivité des formes. (Lœw, Cuboni, Laurent, Berlèse, Janczewski).

La recherche du mécanisme de leur apparition s'imposait donc tout d'abord, et naturellement, il importait de savoir si elles prennent naissance sur le fruit lui-même, ou si elles ont une origine extérieure. A cet effet, M. Pasteur fait construire, au milieu de la saison chaude, une petite serre bien fermée autour d'un cep de vigne, et, contrairement à son attente, il constate, à la maturité, que le foulage d'une certaine quantité des raisins ainsi obtenus, reste sans fermentation. Cette expérience célèbre et fondamentale a été renouvelée depuis par Chamberland; mais il faut aller jusqu'aux travaux de Kloecker et Schioenning, pour la voir reprendre avec beaucoup de soins, non seulement sur la vigne, mais aussi sur d'autres fruits. Elle a, du reste, amené les mêmes résultats généraux que l'expérience de M. Pasteur.

Il semblait donc superflu de revenir sur un fait expérimental paraissant aussi solidement établi; mais à la suite de mes constatations sur l'époque et le *processus* d'apparition des levures sur les raisins, exposées ici dans le chapitre II, il m'était venu à l'esprit quelques soupçons sur le véritable sens à accorder aux résultats de l'expérience elle-même. Bien qu'apparemment tout à fait mûrs, les raisins en particulier avaient pu être cueillis à une époque telle que celle de la vendange, à laquelle normalement les levures sont encore d'une grande rareté à leur surface. C'est, du reste, ce qui m'était arrivé en 1898, quelques jours avant de terminer mes expériences du chapitre II. De plus, MM. Kloecker et Schioenning avaient expérimenté dans des serres ou jardins, et j'avais constaté que les raisins de treilles éloignées du vignoble et de serres, sont rarement porteurs de *Saccharomyces* (1).

Profitant des enseignements de 1898, il m'a donc semblé que

(1) Nous avons vu (expérience relative au groseiller), que certainement l'éloignement du vignoble avec son ensemencement spécial doit intervenir — l'air du vignoble charrie des organismes spéciaux à la vigne, que l'on ne trouve pas dans l'air de la campagne environnante.

l'on pouvait serrer de plus près la question, en opérant en plein vignoble, comme M. Pasteur, en enfermant le raisin seul, comme MM. Kloecker et Schioenning, et en ne procédant à la récolte et aux ensemencements qu'à l'époque de la maturité la plus avancée. Mais pour le second point, on se heurte à de réelles difficultés que l'on ne rencontre pas dans les serres. Combien de fois, en effet, en cherchant à enfermer trop étroitement des raisins en plein développement, n'ai-je pas constaté leur rapide dépérissement. Après avoir étudié la réalisation pratique de ce point particulier, je me suis arrêté au *modus faciendi* suivant : enfermer assez tôt pour établir une sorte d'accoutumance (1), c'est-à-dire quelques semaines après la floraison, les raisins dans des bocaux stériles aussi spacieux que possible (quelques-uns étaient de 5 litres), obturés par de volumineux tampons de coton pénétrant fortement à l'intérieur, (la grappe mûre repose sur ce coton comme sur un matelas), et maintenus en place par de la gaze à pansements fixée au col. L'air, les gaz peuvent donc circuler à l'aise ; la transpiration du fruit n'est pas gênée. Le bocal est fixé solidement à un tuteur, l'ouverture tournée vers le bas ; on le protège à la fois de la pluie et du grand soleil par un manchon en toile cirée que l'on retire à volonté pour laisser pénétrer un afflux convenable de lumière. Contre la moisissure éventuelle, je me suis servi également des grandes allonges piriformes qu'utilise la chimie, et dont on ferme les deux extrémités par du coton ; un courant d'air stérile peut ainsi circuler plus aisément encore à l'intérieur de l'appareil. Sur une vingtaine d'installations ainsi établies dans les premiers jours de juillet, les deux tiers seulement ont pu me fournir des raisins absolument dépourvus de moisissures (Pénicilles), et parvenus à l'état de maturité cherché.

Quelques jours après la vendange (4 octobre), j'ai commencé

(1) Et pour se mettre autant que possible à l'abri des moisissures étrangères au *Dematium*.

à procéder à des ensemencements au moyen des fruits détachés de la grappe avec toutes les précautions aseptiques désirables, et le 20 octobre, lorsque les feuilles de la vigne tombaient en grand nombre, je détachais mes derniers bocalx pour les transporter au laboratoire. Les tubes de moût, dans lesquels je plaçais quatre à cinq grains que les qualités organoleptiques de grains semblables me montraient de maturité excessivement avancée, et de qualité exquise, les plaques habituelles de culture sur lesquelles les fruits étaient frottés, les vases stériles où j'écrasais, au moyen d'une baguette de verre flambée, le reste des grains de la grappe, ne m'ont *jamais donné le moindre départ de fermentation*. Mais j'ai pu faire la constatation d'importance capitale, que mes plaques se recouvraient de *très nombreuses colonies de Dematium*; la cuvée minuscule prenant aussi une consistance mucilagineuse due à cet organisme.

Je pense que nous voilà définitivement fixés dans la négative sur la descendance des *Saccharomyces*, à partir du *Dematium pullulans*; dans la façon générale dont se comporte cet organisme, et notamment dans les essais de sporulation, nous avons déjà vu s'élever une barrière contre toute idée d'assimilation spécifique.

Transformations observées chez les Saccharomyces à la surface du fruit. — Il semble remarquable que les *Saccharomyces* vrais (1), dont on n'observe jamais que des formes dissociées dans les conditions habituelles, ne trahissent pas plus souvent leur origine supposée. Aux confins en quelque sorte de leur groupe, on trouve cependant des formes présentant une tendance marquée, surtout

(1) J'admets la définition suivante des *Saccharomycès*; champignons unicellulaires présentant à divers degrés, la propriété de sécréter en anaérobie une enzyme (Büchner) dédoublant le glucose en alcool et acide carbonique, et susceptibles, dans des conditions de végétation spéciales, de donner des endospores au nombre de quatre ou plus rarement de huit. Les levures sauvages, les *Torulas* et même le *Dematium*, peuvent donner de petites quantités d'alcool dans les moûts et ne fournissent jamais d'endospores.

à l'air, à retourner vers l'état mycélien, et c'est même un bon caractère pour reconnaître, de prime abord, une espèce à allure de *Saccharomyces* et dépourvue, ou à peu près, du pouvoir ferment (alcoolique) du glucose. Tel est l'exemple classique du *Mycoderma vini*, et, si nous allons plus loin, du *Dematium pullulans*. Pour tous ces champignons ferments, on constate d'ailleurs un fait absolument général et bien connu dans son ensemble : à part quelques conditions accessoires d'acidité ou d'alcalinité, la végétation aérobie les fait évoluer vers l'état mycélien ; la vie anaérobie ou fermentative, au contraire, vers l'état dissocié à cellules arrondies. Il en est ainsi des Mucors, des Pénicilles, des levures sauvages, mais chez les *Saccharomyces*, on ne peut plus observer qu'une légère indication de cette règle (voiles).

Depuis quelques années, bon nombre d'efforts se sont portés vers l'obtention des formes anormales des *Saccharomyces*. En ce sens, se sont produites des tentatives d'analyse et des tentatives de synthèse. Juhler [21] pense avoir réussi à transformer l'*Aspergillus orizæ* en un *Saccharomyces* ; mais il semble aujourd'hui bien établi, Kloecker et Schioenning [26], que jamais, dans les cultures, on n'a réussi à opérer la transformation d'aucun champignon en un *Saccharomyces*, ni à faire produire ainsi aux *Saccharomyces*, des formes révélatrices de leur origine. Dans cette voie, M. A. Joergensen, le premier, s'est rendu compte de l'importance, comme milieu de culture, des substratum naturels, et il insiste pour que l'on se place, à ce point de vue, dans les conditions les plus conformes aux processus ambiants. Dans un mémoire qui fit époque [22], ce savant prétend avoir réussi à transformer le *Dematium pullulans* en un vrai *Saccharomyces* ; mais ses conclusions ont été absolument infirmées par celles de Kloecker et Schioenning [26].

La technique de M. Joergensen consiste en des ensemencements sur des raisins murs et cueillis, de diverses provenances

et placés à l'étuve. Tenant compte des enseignements de cet auteur, j'ai institué des expériences analogues, qu'il me reste à décrire : Mais tout d'abord, au lieu de partir du *Dematium* pour remonter jusqu'aux *Saccharomycès*, j'ai voulu suivre une marche inverse que je crois préférable, en ce sens qu'elle assure mieux le point de départ, et contrairement aussi à lui, j'ai pratiqué desensemencements, non plus sur des raisins murs et cueillis, mais sur des raisins *restant attachés au cep*, en plein vignoble, et à tous les états de développement.

Les principes fondamentaux présidant aux recherches bactériologiques commandent de pratiquer desensemencements sur des milieux stériles ; aussi ma première préoccupation a-t-elle été de chercher un procédé efficace pour débarrasser mes raisins verts des organismes dont ils sont normalement porteurs ; mais il est superflu de faire remarquer que nous sommes ici en présence d'un milieu vivant, en pleine évolution, et certainement plus sensible aux antiseptiques, et plus fragile que les champignons, et particulièrement les spores de penicilles qui se rencontrent à sa surface. J'ai essayé successivement la solution de sublimé acide au 1/1000 des laboratoires, le sulfate de cuivre à divers états de concentration, l'éther ordinaire, le formol, etc. ; mais lorsque j'ai atteint le but cherché, j'ai obtenu le dépérissement rapide des fruits, en fixant la couche cellulaire superficielle. Par contre, une action ménagée des antiseptiques, me donnait une luxuriante végétation de pénicilles, envahissant au bout de quelques jours les vases stériles où je renfermais les grappes, pour les préserver d'un nouvel ensemencement par l'afflux des germes extérieurs.

Fatigué de ces essais infructueux, j'ai donc cru devoir abandonner complètement la stérilisation, voyant du reste, dans cette violation des principes, le gros avantage de rester placé dans des conditions infiniment plus naturelles, en laissant le substratum parfaitement intact. De plus, comme les ensemen-

cements sont destinés à être examinés à des grossissements pouvant atteindre facilement 400 diamètres, je pensais me trouver suffisamment à l'abri de toute cause d'erreur grossière, due au développement d'organismes étrangers.

Pour déposer des *Saccharomycès* à la surface des fruits, j'ai imaginé un procédé fort simple ; je délaye le produit d'une culture, dans de l'eau stérilisée placée au fond d'un flacon muni d'un pulvérisateur de Richardson. S'il s'agit du *Dematium*, nous avons vu que l'on ne réussit qu'à la seule condition de prendre une culture sur de la gélose au moût de raisin vert. On sait que la surface du fruit ne se laisse pas mouiller facilement par l'eau ; aussi, dès l'afflux du brouillard sortant du pulvérisateur, voit-on le raisin se recouvrir de fines gouttelettes non confluentes. Après évaporation, on peut constater, par l'examen microscopique de fins rubans tangentiels enlevés délicatement au rasoir, de petits amas parfaitement séparés de cellules de levure.

Le 20 août (1), j'ai préparé ainsi, avec ma levure principale de Champagne, une dizaine de grappes de raisin blanc, mises éventuellement à l'abri de la pluie ; quelques-unes furent enfermées sans trop en souffrir, dans des bocaux, suivant la technique exposée au commencement de ce chapitre. Pendant les douze premiers jours, les grains provenant des grappes libres ainsi traitées, m'ont donné régulièrement des fermentations dans les tubes de moût ; mais passé ce délai, on constatait une diminution progressive des grains fertiles ; enfin, le 10 septembre, tous les tubes restant sans fermentation, on aurait pu croire la levure morte. Cependant, j'avais suivi au microscope les transformations qui pouvaient se passer sur les raisins, et remarqué, vers le quinzième jour, dérivant de quelques petits amas de levure initiale toujours bien faciles à reconnaître, des

(1) Les raisins verts atteignant approximativement la grosseur normale.

filaments semblables à ceux que j'avais constatés pour le *Dema-*
tium, au début de la croissance du fruit.

J'ai pensé alors tout naturellement à des formes étrangères à la levure, et concentré toute mon attention sur ce point. Les filaments en question étaient faciles à différencier de ceux de l'*Oïdium* d'ailleurs ici très rares, et toujours reconnaissables à leur calibre beaucoup plus faible, leur trajet rectiligne et leur disposition en réseau géométrique; de ceux également des *Septosporium*, assez abondants à ce moment de l'année sur les raisins et s'en rapprochant d'avantage, mais dérivant toujours de l'assemblage piriforme si caractéristique. Du reste, l'observation de quelques petits amas de levure, formés de deux à trois éléments au plus, ou même d'une cellule isolée, et donnant manifestement naissance aux filaments en question, leva tous mes doutes.

On observe alors (A fig. suiv.) que les éléments des amas subissent une sorte de gélification qui les agglutine, et la présence de corps bruns, mêlés aux amas les plus volumineux. Je n'ai pas tardé à découvrir sur les filaments B qui nous appa-
raissent

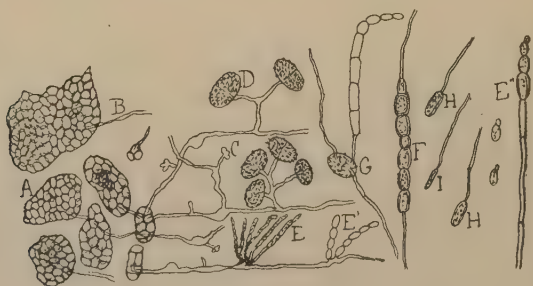


Fig. 3.

sent de calibre inégal, peu cloisonnés, avec des crampons ou des suçoirs, la formation de grosses spores que je représente en D. Ces corps se distinguent par leurs grandes dimensions, leur aspect grisâtre, hérissé de petites pointes; ils semblent

formés de deux cellules accolées transversalement. Désireux d'apporter sur ces faits, un caractère d'authenticité, je donne à la fin de ce travail les photographies micrographiques de ces différents aspects ; on tiendra compte, je l'espère, des difficultés d'exécution et aussi de reproduction.

Des conidies de deux sortes E et E' prennent naissance sur les filaments. Les premières, toujours très colorées, en pinceaux bacillaires, forment souvent sur les amas de levures des agglomérations tellement compactes qu'elles interceptent toute lumière transmise ; les secondes se groupent en chapelets ovoïdes. Sur les filaments s'intercalent souvent des files de cellules à parois épaisses F ; c'est à la fin de la végétation que cet aspect se montre le plus fréquent (1).

Vers le 15 septembre, la transparence commençante des raisins blancs annonce le début de la maturité, et j'observe alors sur ces mêmes raisins, au voisinage des amas, la germination sur place des spores (en G) et des conidies (en H, I). Les nouveaux filaments issus de ces formes, tantôt sont fréquemment cloisonnés avec des extrémités à cellules arrondies et bourgeonnantes, tantôt identiques aux filaments dérivés des amas primitifs. Par l'introduction de quelques grains isolés dans les tubes de moût, je réussis à obtenir deux fois la fermentation ; il est donc probable que ces formes anormales se développent difficilement dans les milieux de culture habituels ; elles seraient affaiblies, suivant l'expression consacrée.

Le 8 septembre (2), après mes premières constatations, j'avais recommencé les mêmes pulvérisations sur les raisins, avec de la levure de vin, de la levure de bière et du *Dematium* ; une dizaine de jours plus tard, j'observais pour les amas de

(1) Nous l'avons déjà observé chez le *Dematium*, au début du développement du fruit.

(2) Des abris aménagés dès le début de la saison protégeaient mes raisins d'expériences.

levure de bière, la même émission de filaments. Très préoccupé à ce moment par les phénomènes que j'observais sur la levure de Champagne elle-même, je n'ai pas remarqué la formation des spores et des conidies. Pour le *Dematium*, j'ai obtenu, au contraire, la formation rapide des filaments porteurs de grandes quantités de conidies bacillaires.

Ne perdant surtout pas de vue ce qui se passe sur les raisins non traités, dans les jours qui précéderent immédiatement la vendange, contrariés malheureusement par de grands vents et des pluies abondantes, et aussi jusqu'après la récolte, j'ai multiplié mes observations, et vu germer des spores D, mais surtout les conidies E. Contrairement à ce que l'on pourrait penser, ces formes sont loin d'être très fréquentes sur les raisins bruts, et on examine souvent plusieurs préparations avant de rencontrer de quoi se rendre compte de ce qui précède. L'observation directe des *Saccharomycès* à la surface des raisins est des plus rares; pour qui est accoutumé de voir des cellules de *Dematium*, c'est surtout cet organisme que l'on y rencontre. Le lavage des raisins, suivi d'une centrifugation, ne donne pas, non plus, de résultats bien appréciables.

Le 16 octobre, douze jours après la vendange, j'avais ouvert à mon laboratoire les bocalx de raisins garnis de levure de Champagne le 22 août, et aucun des principaux grains, sans exception, *n'a manqué de me donner la fermentation* (1) caractéristique dans les tubes de moût, et les colonies de *Saccharomycès mêlées de Dematium* sur les plaques gélosées. C'est même avec ces raisins mis à l'abri des poussières de l'air, que j'ai obtenu les meilleures préparations microscopiques. Les spores D étaient absentes(2); les formes F et E'', au contraire très fréquentes; les

(1) Nous sommes ici en apparente contradiction avec la remarque de Hansen [14], qui a vu disparaître au bout de quelques jours, les levures déposées sur les organes verts.

(2) Sans doute détachées.

premières seraient donc plus spéciales aux organes verts, et toutes *auraient besoin de la maturité du substratum pour donner les Saccharomycès que nous observons dans les cultures.*

Voilà, sans essais d'interprétation, les faits tels que je les ai observés ; il est possible que tout ou partie de ce processus se passe sur un substratum inconnu, et peut-être bien sur les organes verts de la plante. Dans ce cas, si l'expérience mémorable de M. Pasteur relatée ci-dessus n'a pas donné les résultats attendus par ce savant, il faudrait alors, et sans doute, y voir l'effet de la suppression des causes naturelles de dissémination, tels que les insectes et les grands mouvements de l'air. Ces conditions défavorables sont du reste réalisées lorsque la vendange est contrariée par les mauvais temps.

Vu, bon à imprimer :

Le Président de la Thèse :

A. M. EDWARDS.

Vu :

Le Directeur de l'Ecole :

L'assesseur délégué,

MILNE EDWARDS.

Vu et permis d'imprimer :

Le Vice-Recteur de l'Académie de Paris

GRÉARD.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE (PRINCIPAUX MÉMOIRES)

1. 1864. — DE BARY. — Morphologie und physiologie der Pilze.
2. 1867-68. — LOEW. — Ueber *Dematium Pullulans*. Pringsh Jahrbuch.
3. 1870. — REESS. — Botanische untersuchungen über die alcoolgaerungspilze. Leipzig.
4. 1872. — PASTEUR. — Étude sur le vin.
5. 1876. — — — Étude sur la bière,
6. 1878. — — — Note sur la fermentation des fruits et sur la diffusion des germes des levures alcooliques. Comptes rendus de l'Académie des Sciences.
7. 1879. — CHAMBERLAND. — Recherches sur l'origine et le développement des organismes microscopiques.
8. 1884. — BOUTROUX. — Sur la conservation des ferments alcooliques dans la nature (Ann. des Sc. Nat. Botanique, Tome 17, 6^e série).
9. 1884. — DE BARY. — Vergleichende morphologie und Biologie der Pilze Mycetozeen und Bakterien. Leipzig.
10. 1884. — HANSEN. — Recherches sur la morphologie et la physiologie des ferments alcooliques (Comptes rendus du laborat. de Carlsberg, II. liv. 2.
11. 1885. — Id. (vol. V).
12. 1888. — LAURENT E. — Recherches sur le polymorphisme du *Cladosporium herbarum* (Ann. Institut Pasteur, II).
13. 1888. — LINDNER. — Wochenschrift für Brauerei, n° 15.
14. 1890. — HANSEN. — Nouvelles recherches sur la circulation du sacch. apiculatus dans la nature (Ann. des Sc. Nat. Botan. 7^e série.
15. 1891. — HANSEN. — Recherches sur la morphologie et la physiologie

des ferments alcooliques (Comptes-rendus du laboratoire de Carlsberg, vol. I).

16. 1893. — CUBONI ET PIZZIGONI. — Contribuzione allo studio dei fermenti del vino. (Staz. speriment. agrar. ital. XXV).
17. 1894. — HAUTEFEUILLE ET PERRY. — Contribution à l'étude des levures (Comptes-rendus de l'Académie des Sciences).
18. 1894. — AM. BERLÈSE ET ANT. BERLÈSE. — Une série de mémoires, sur la biologie des levures de vin, (Rivista di Patologia végétale).
19. 1894. — JANCZEWSKI. — Recherches sur le *Cladosporium herbarum*. Bulletin Acad. Sciences de Cracovie, juin.
20. 1895. — ANT. N. BERLÈSE. — Première contribution à l'étude de la morphologie et de la biologie des *Cladosporium* et *Dematium*. Bulletin de la Soc. mycologique de France.
21. 1895. — G. BERTRAND. — Une nouvelle classe de ferments solubles. Comptes rendus de l'Académie des Sciences, 4, 11 février.
 JUHLER. — Ueber die Umbildung des *Aspergillus orizæ* in einen *Saccharomyceten*. (Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde, 2 Abt. 1, 1895).
22. 1895. — A. JOERGENSEN. — Der Ursprung der Weinhefen (Centralbl. für Bakt. u. Parasit. 2 Abt. 1.).

Principales analyses par :

DUCLAUX. — Annales de l'Institut Pasteur, 1897.

SAUVAGEAU. — Revue de viticulture, 1897,

23. 1896. — BAY CHRIST. — Is the red *Torula* a genuine *Saccharomyces*. Centralbl. für Bakt. II, Abt.
24. 1896. — KAYSER. — Les levures. Paris, (Encyclopédie Leauté).
25. 1896. — MARTINAND ET RIETSCH. — Des microorganismes que l'on rencontre sur les raisins murs et de leur développement pendant la fermentation. (Comptes rendus. Acad. Sciences, vol. CXII).
26. 1897. — KLÖCKER ET SCHIÖNNING. — Que savons-nous de l'origine des *Saccharomyces*. (Annales de Micrographie, juin, juillet, août).
27. 1898. — SKERST. — Beiträge zur kenntniss der *Dematium* pull. De Bary. Analyse Centralbl. für Bakter. II. Abt. B d IV, p. 864-865.
28. 1898. — J. A. CORDIER. — Contribution à la biologie des levures de vin. (Comptes-rendus de l'Académie des Sciences, 6 novembre).
29. 1898. — A. JOERGENSEN. — Les microorganismes de la fermentation. Paris.
30. 1899. — WELEMSKI. — Ueber sporenbildung bei *Dematium pullu-*

lans. (de Bary). — Centralblatt für bakteriologie. Zweite abtheilung. N° 9, 15 mai 1899.

31. 1899. — DOMINGOS FREIRE. — Les microbes des fleurs. (Comptes rendus Acad. des Sciences, mai.
32. 1899. — KLÖCKER*ET SCHIÖNNING. — Ueber Durchwachsungen u. abnorme. Konidien bildungen bei *Dematium pullulans*. De Bary. u. bei anderen Pilzen. Centralblatt. für Bakt. II, Abt. B. de V. n° 14.
-



FIG. 1.

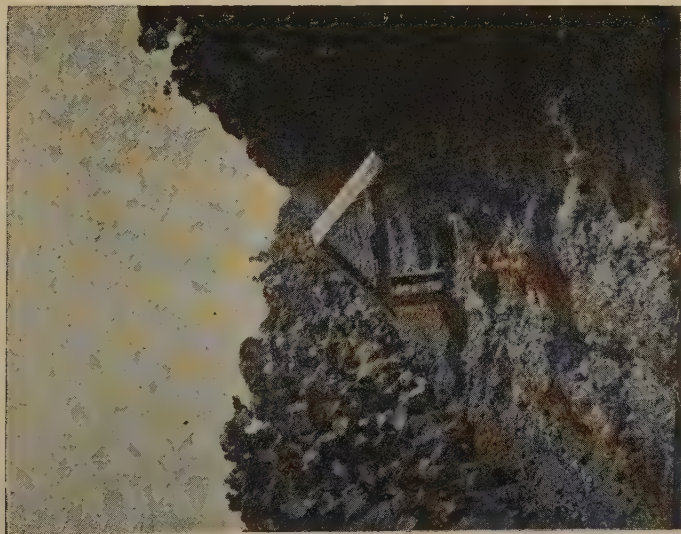


FIG. 2.

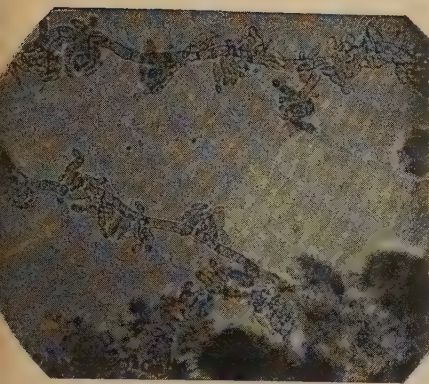


FIG. 3.

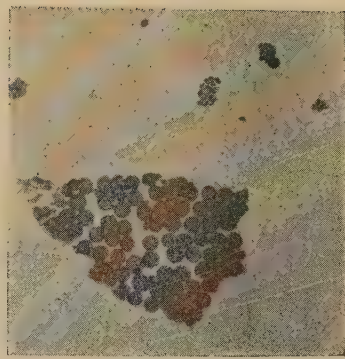


FIG. 4.

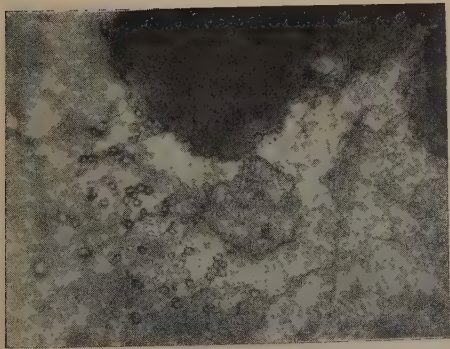


FIG. 5.

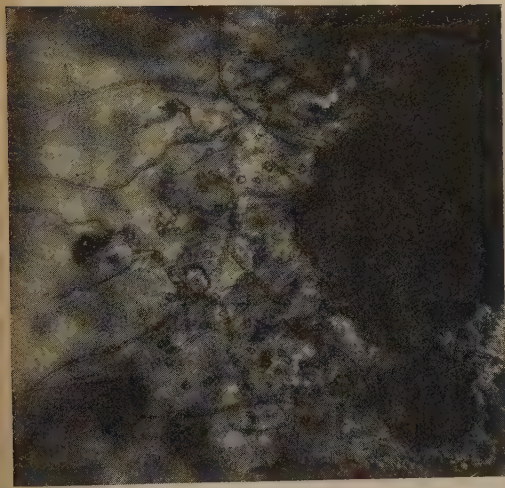


FIG. 6.



FIG. 7.

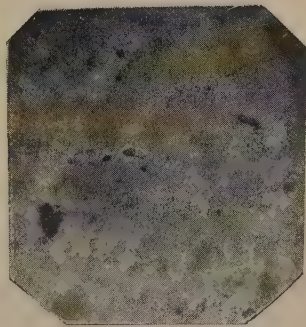


FIG. 8.

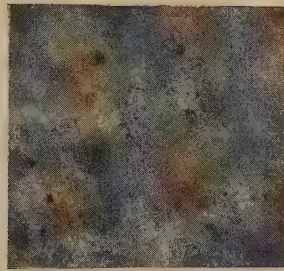


FIG. 9.



FIG. 10.

EXPLICATION DES FIGURES

- Fig. n° 1. — Installation de raisins enfermés verts dans des bocaux stériles. Clos Pommery, 27 juin 1899.
- n° 2. — Abri dans les vignes pour la protection des plaques gélosées destinées à l'analyse de l'air, 1898.
- n° 3. — Photographie d'une culture de *Dematium pull.* sur gélose au moût de raisin. Naissance des formes dissociées levuriformes sur les filaments.
- n° 4. — Levure principale de Champagne (culture âgée sur milieu très acide).
- n° 5. — Production des spores. D (schéma intercalé dans le texte), sur les filaments* B issus des amas A. Un amas beaucoup plus volumineux apparaissant en plus foncé se trouve à gauche, 400 diam. environ.
- n° 6. — Même préparation un peu plus âgée ; la mise au point est légèrement différente, même grossissement.
- n° 7. — Même préparation encore plus âgée ; on voit les spores D, le mycélium cloisonné ; on assiste sur ces dernières à la naissance des formes dissociées. Grossissement plus considérable. 600 diamètres environ.
- n° 8 et 9. — Germination de spores et de conidies à la surface du raisin, au moment de la vendange.
- n° 10. — Culture sur lamelle du *Dematium pull.* en moût de raisin ; on voit au centre les corps observés par Weleminsky, dans un article de filament. La préparation est traversée par un filament de coton.
-

